

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NMDA/GLY_B
DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL
NA MEDIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DEFENSIVO DE RATOS

Karina Valerim Teixeira

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis - SC

Junho - 2002

"Ainda que eu falasse línguas,
as dos homens e dos anjos,
se eu não tivesse o amor,
seria como sino ruidoso
ou como címbalo estridente.

Ainda que eu tivesse o dom da profecia,
o conhecimento de todos os mistérios e
de toda a ciência;
ainda que eu tivesse toda a fé,
a ponto de transportar montanhas,
se não tivesse o amor,
eu não seria nada.

O amor jamais passará.
As profecias desaparecerão,
as línguas cessarão,
e a ciência também desaparecerá.

Agora, portanto, permanecem estas três
coisas: a fé, a esperança e o amor.
A maior delas, porém, é o amor".

(1 Coríntios 13, 1-2 8 13)

Aos meus pais,
por serem tão bons.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pelo exemplo de ética profissional, por ter me ensinado a ver o lado lúdico da ciência, por ter acreditado em mim e por todos estes anos de convívio. Agradeço também à Jania, Bruno, André e Érica por acrescentarem um toque familiar à rotina do laboratório e tornarem estes anos mais leves.

Aos professores membros da banca examinadora do doutorado, Frederico G. Graeff, Francisco S. Guimarães, Reinaldo N. Takahashi, Thereza C.M. de Lima Nogueira, como titulares, Carlos Rogério Tonussi, Moacir Faria, como suplentes, pela contribuição para a minha formação científica.

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pelo apoio e contribuição à minha formação científica. Em especial, aos professores que fizeram parte da banca de qualificação ao título de doutor, Jamil Assrey, Reinaldo N. Takahashi, Thereza C.M. de Lima Nogueira, como membros titulares e Carlos Rogério Tonussi como membro suplente.

Aos professores membros da banca examinadora do mestrado, Claudio Toledo, Newton Canteras, Tadeu Lemos, pelo incentivo para que eu continuasse no caminho científico.

Ao apoio financeiro por parte da FAPESP, CNPq e CAPES.

Aos funcionários e amigos da Coordenadoria Especial de Farmacologia.

Aos colegas, freqüentadores e amigos do laboratório de Neurobiologia Comportamental, pela colaboração e amizade. Cilene, Edmar, Elaine, Lúcia, Patrícia e tantos outros... Em

especial, Anna Paula, Leandro, Nelson que estiveram tão presentes na minha vida nestes últimos 4 anos.

A todos que leram os originais desta tese e fizeram comentários para o aprimoramento do texto.

À Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), onde eu iniciei minha vida profissional como docente. E a todos os alunos que a cada dia me ensinam o quanto eu ainda tenho que aprender.

Aos meus amigos (as) e primos (as), pela torcida.

Ao meu gato, companheiro constante nas horas incontáveis ao lado do computador.

À minha família, em especial aos meus pais, irmãos, cunhadas e a minha sobrinha, que sempre me apoiaram e me incentivaram.

Ao meu noivo, Benito José Remor Jr., por permanecer ao meu lado e por ter dado um colorido especial à minha vida.

A Deus, pois sem Ele eu nada teria conseguido.

Enfim, a todos que, de alguma maneira, me ajudaram.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal	03
1.2. Participação dos AAE no Comportamento Defensivo	08
1.3. O Labirinto em Cruz Elevado como modelo para estudar comportamento defensivo	13
1.4. Participação dos receptores NMDA/GLY _B da SCPd na modulação do Comportamento defensivo	15
2. OBJETIVOS	18
3. PROCEDIMENTOS GERAIS	19
3.1. Animais	19
3.2. Cirurgia Estereotáxica	19
3.3. Cânulas	22
3.4. Microinjeção Intracerebral	22
3.5. Teste Comportamental	23
3.6. Protocolo Experimental	24
3.7. Dispositivo de Registro comportamental	26
3.8. Histologia	27
3.9. Análise Estatística	28
3.10. Drogas e Soluções	29
4. ETAPAS EXPERIMENTAIS	30
4.A. Efeito da inativação temporária e reversível da SCPd sobre os comportamentos observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE	30
4.A.1. OBJETIVO EXPERIMENTAL	31
4.A.2. PROCEDIMENTO	31
4.A.3. RESULTADOS	32
4.A.4. DISCUSSÃO	40
4.B. Efeitos da estimulação química com GLU ou com a associação GLY + GLU, em áreas rostrais e caudais da SCPd, sobre os comportamentos observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.	44
4.B.1. OBJETIVO EXPERIMENTAL	46
4.B.2. PROCEDIMENTO	46
4.B.3. RESULTADOS	47
4.B.4. DISCUSSÃO	61

4.C. Efeitos da estimulação química com agonistas do receptor NMDA/GLY _B , em áreas rostrais e caudais da SCPd, sobre os comportamentos observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE	66
4.C.1. OBJETIVO EXPERIMENTAL	68
4.C.2. PROCEDIMENTO	68
4.C.3. RESULTADOS	69
4.C.4. DISCUSSÃO	92
	97
5. DISCUSSÃO GERAL	
<hr/>	
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
<hr/>	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
<hr/>	

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE	-	aminoácidos excitatórios
ANOVA	-	análise de variância
AP	-	coordenada estereotóxica anteroposterior
DSER	-	D-serina
DV	-	coordenada estereotóxica dorsoventral
FBF	-	freqüência de entrada nos braços fechados
GLU	-	glutamato
GLY	-	glicina
GLY _A	-	designa o sítio da GLY sensível à estricnina
GLY _B	-	designa o sítio da GLY acoplado ao receptor NMDA
GLY-GLU	-	associação GLY 120 nmol + GLU 20 ou 40 nmol
HA966	-	(±)-3-Amino-1-hidroxi-2-pirrolidona
IP	-	intraperitoneal
IC	-	índice de conflito
LCE	-	labirinto em cruz elevado
LSD	-	teste estatístico de comparação combinada
ML	-	coordenada estereotóxica mediolateral
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
NR	-	subunidades do receptor NMDA
%FEA	-	porcentagem de freqüência de entrada nos braços abertos em relação à freqüência total de entradas em qualquer um dos braços
%TPA	-	porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação à permanência total em qualquer um dos braços
SCP	-	substância cinzenta periaquedutal
SCPd	-	porção dorsal da SCP
SNC	-	sistema nervoso central
TPC	-	tempo de permanência na plataforma central

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Fig. 1	Esquema ilustrando a organização colunar das diferentes subdivisões ao longo do eixo rostrocaudal da SCP.	06
Fig. 2	Esquema ilustrativo do receptor NMDA, com seus diversos sítios de ligação.	08
Fig. 3	Diagramas de cortes mesencefálicos coronais do cérebro de rato, mostrando os sítios das microinjeções nas porções rostral e caudal da SCPd.	28
Fig. 4	Efeitos na atividade nos braços abertos após a inativação de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção de lidocaína em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	34
Fig. 5	Análise minuto-a-minuto da %TBA após a inativação de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção de lidocaína em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	37
TABELA 1	Efeitos da inativação com lidocaína na SCPd rostral, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	39
TABELA 2	Efeitos da inativação com lidocaína na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	40
Fig. 6	Efeitos na atividade nos braços abertos após estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção GLU 20 e 40 nmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	49
Fig. 7	Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção GLY-GLU 20 e 40 nmol em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.	51
TABELA 3	Efeitos da estimulação química com GLU 20 e 40 nmol na SCPd rostral, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	52
TABELA 4	Efeitos da estimulação química com GLU 20 e 40 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	53
Fig. 8	Efeitos na atividade nos braços abertos após a estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção GLY-GLU 20 nmol e 40 nmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	56
Fig. 9	Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção GLY-GLU 20 e 40 nmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	58
TABELA 5	Efeitos da estimulação química com GLY-GLU 20 e 40 nmol na SCPd rostral, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	60
TABELA 6	Efeitos da estimulação química com GLY-GLU 20 e 40 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados	60

em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

Fig.10	Efeitos na atividade nos braços abertos após estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção NMDA 25, 50 e 100 pmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	71
Fig. 11	Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção NMDA 25, 50 e 100 pmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	74
TABELA 7	Efeitos da estimulação química com NMDA 25, 50 e 100 pmol na SCPd rostral, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	76
TABELA 8	Efeitos da estimulação química com NMDA 25, 50 e 100 pmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	78
Fig. 12	Efeitos na atividade nos braços abertos após estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção GLY 120 e 180 nmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	80
Fig. 13	Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd com microinjeção GLY 120 e 180 nmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	82
TABELA 9	Efeitos da estimulação química com GLY 120 e 180 nmol na SCPd rostral, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	83
TABELA 10	Efeitos da estimulação química com GLY 120 e 180 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	84
Fig. 14	Efeitos na atividade nos braços abertos após estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos com microinjeção DSER 160 e 320 nmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	87
Fig. 15	Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos com microinjeção DSER 160 e 320 nmol em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	89
TABELA 11	Efeitos da estimulação química com DSER 160 e 320 nmol na SCPd rostral, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	90
TABELA 12	Efeitos da estimulação química com DSER 160 e 320 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.	91
TABELA 13	Principais eventos comportamentais observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE, após diferentes tratamentos em áreas rostrais e caudais da SCPd.	106

RESUMO

Nos últimos anos, a estimulação elétrica e química da porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal (SCPd) têm contribuído para o estudo do comportamento defensivo, possivelmente relacionado ao medo e ansiedade.

No presente trabalho procuramos entender melhor o papel da SCPd nos comportamentos observados em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE), após inativação temporária com lidocaína ou estimulação química com agonistas do receptor NMDA/GLY_B. Foram utilizados ratos Wistar machos de 4 meses de idade, implantados esterotaxicamente com uma cânula-guia direcionada para áreas rostrais (AP = -5.8 mm) e caudais (AP = -7.6 mm) da SCPd. Os animais foram submetidos ao teste/re-teste no LCE, onde foram observados parâmetros possivelmente relacionados a ansiedade (esquiva) e atividade geral.

Nossos resultados mostram que tanto áreas rostrais como caudais da SCPd podem participar no aprendizado da resposta de esquiva que ocorre durante a primeira exposição ao LCE, isto porque a inativação da SCPd no teste afeta a retenção desta resposta e abole a expressão de uma resposta mais acentuada de medo observada no re-teste no LCE.

Os agonistas NMDA/GLY_B utilizados podem afetar os comportamentos de esquiva de maneira diferenciada, dependente da dose e da área-alvo na SCPd. Mais especificamente, a estimulação química com GLU provocou

aumento na resposta de esquiva no teste, na dose de 20 nmol, na porção caudal, enquanto que a associação GLY-GLU 20 nmol provocou este efeito restrito à porção rostral. O NMDA aumentou a resposta de esquiva no teste na dose 25 pmol, na SCPd caudal e nas doses 50 e 100 pmol, na SCPd rostral. No re-teste, o grupo NMDA 50 da SCPd rostral mostrou retenção da resposta de esquiva, com prejuízo na atividade geral. A estimulação química do sítio GLY_B (GLY e DSER) aumenta seletivamente as respostas de esquiva no teste. E no re-teste o grupo DSER 160 da SCPd caudal mostrou retenção da resposta de esquiva sem comprometimento dos parâmetros de atividade geral.

Nossos resultados mostram a importância da SCPd em comportamentos defensivos mais sutis, envolvendo respostas de esquiva; indicam que esta estrutura pode participar de processos cognitivos subjacentes a respostas aprendidas de medo e contribuem para a validação do re-teste no LCE como um modelo útil para estudar tais respostas. Mostram também evidências de que a estimulação química do sítio GLY_B no receptor NMDA pode ser uma ferramenta útil no estudo do papel da ativação dos receptores NMDA/GLY_B na mediação do repertório defensivo e comportamentos, possivelmente, relacionados ao medo e ansiedade.

ABSTRACT

The dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) is a brain structure which seems to be essential for the coordination of defensive, fear and anxiety-like behaviors.

The present work was appraised to evaluate the role of dPAG mediating behavioral responses in rats submitted to test/retest in the elevated plus maze (EPM). Two techniques were used: reversible inactivation using lidocaine and chemical stimulation using NMDA/GLY_B agonists. Male Wistar 4 months old rats, were implanted stereotaxically with guide cannulas directed to rostral (AP= -5.8 mm) and caudal (AP = -7.6 mm) areas of the dPAG. Animals were submitted to test/retest in the EPM and the performance was assessed through parameters related to anxiety (avoidance) and general activity.

Results obtained using lidocaine have shown that both rostral and caudal areas of the dPAG might participate in the avoidance response learning, which occurs during the first exposure to the EPM, because inactivation of dPAG during the test prevented the retention of the avoidance response in the retest.

Results have also shown that NMDA/GLY_B agonists can affect avoidance behaviors in a dose and area dependent fashion within the dPAG. More specifically, GLU 20 nmol produced an increase in the avoidance response in the test when applied to the caudal dPAG, while GLY-GLU 20 nmol

produced this effect restricted to the rostral dPAG. NMDA increased the avoidance response in the test at 25 pmol dose in the caudal dPAG and at 50 and 100 pmol within the rostral dPAG. In the retest, NMDA 50 group increased the retention of avoidance response, but showed some impairment in locomotion. With regard to GLY_B agonists, they seem to selectively increase avoidance response during test, without affecting general activity. In the retest, DSER 160 group showed retention of avoidance response without affecting locomotion.

Our results show the dPAG relevance in more subtle defensive behaviors, such as phobic avoidance response; they also indicate that this structure can participate of the acquisition and retention of learned fear responses and show some evidence that chemical stimulation with GLY_B agonists may be a useful tool to study the role of activation of NMDA/GLY_B receptor in the mediation of defensive repertoire and fear-like behavior, possibly related to anxiety.

1. INTRODUÇÃO

O repertório defensivo inclui reações coordenadas e específicas, que são a principal garantia de preservação das espécies (Endler, 1986). Para o estudo de tais respostas comportamentais, duas principais medidas são utilizadas: 1) o componente motor, representando as posturas e os atos defensivos em resposta ao meio externo; 2) o componente neurovegetativo, representando os vários mecanismos de adaptação e preparação do meio interno para efetuar a resposta defensiva.

O comportamento defensivo em roedores foi bastante estudado por Blanchard e Blanchard (1989; 1990). Eles mostraram que a intensidade desse comportamento no roedor contra o experimentador pode variar, tendo como fator chave a distância entre ambos. O animal pode apresentar reações de congelamento até fuga em resposta à aproximação, ou postura de ameaça defensiva e ataque quando acuado. Esses resultados corroboram estudos que relatam que o tipo de oponente, seu tamanho e proximidade, a existência ou não de vias de fuga, determinam as tendências naturais do animal em ameaçar, atacar ou escapar (para revisão ver Bandler, 1988; Graeff, 1990).

Uma outra contribuição importante para o entendimento do comportamento defensivo é o estudo envolvendo gatos e ratos, onde Blanchard e Blanchard (1990) demonstraram que reações defensivas poderiam ser obtidas em resposta a uma

ameaça potencial, como o odor de gato. Seus experimentos mostraram que ratos previamente expostos a gatos, quando reintroduzidos no mesmo ambiente sem a presença do predador, exibiam um conjunto diferente de reações comportamentais, incluindo reações de congelamento, avaliação de risco e supressão de comportamento "ongoing" (como por exemplo, o ato de comer e beber em animais privados de água e comida).

O substrato neural para esses comportamentos ainda não está totalmente estabelecido. Adams (1979) sugeriu a existência de um sistema motivacional defensivo, responsável pela integração dos diferentes estímulos com o padrão adequado de resposta motora, onde a Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP) parece ter um papel-chave.

Outros autores procuraram relacionar estruturas cerebrais com formas ativas e passivas (inibitórias) de comportamentos defensivos. Em 1981, Graeff postulou que a amígdala, o hipotálamo medial e a SCP seriam os principais componentes de um 'Sistema Cerebral Aversivo', responsável pela elaboração de manifestações fisiológicas e psicológicas de estados motivacionais negativos (para revisão ver Graeff, 1990). Gray (1982) sugeriu que o sistema septo-hipocampal seria a peça-chave de um "Sistema de Inibição Comportamental" responsável pelo controle da supressão do comportamento "ongoing", aumento na vigilância e aumento no estado de alerta do animal que podem ser evocados por dor, punição, frustração, novidade ou incerteza.

Mais recentemente, Gray e McNaughton (2000) fizeram uma

integração entre os conceitos de distância defensiva e reações de conflito aproximação/esquiva e sugeriram a ocorrência de ativação de vias diferenciadas de acordo com a fonte de ameaça. Em caso de possibilidade de aproximação, estruturas como o corpo cingulado posterior e o sistema septo-hipocampal seriam ativadas, enquanto em caso de possibilidade de esquiva ocorreria a ativação de outras estruturas, tais como o corpo cingulado anterior, a amígdala, o hipotálamo medial e a SCP.

1.1. Substância Cinzenta Periaquedutal

Nos últimos anos, a SCP tem sido relacionada a diferentes funções que incluem: regulação autonômica, vocalização, reações de raiva, medo e possivelmente ansiedade, comportamento de lordose, processamento e modulação da dor, entre outras (para revisão ver Behbehani, 1995; Beitz, 1995). O que essas respostas têm em comum não está ainda suficientemente esclarecido, exceto que todas parecem apresentar implicações viscerais e emocionais associadas ao sistema límbico (Mantyh, 1982a), ao qual a SCP pertence (Nauta, 1958).

Desde a década de 60, o entendimento das funções da SCP é alvo de muito interesse. Um dos desencadeadores desse evento foi o relato de Reynolds (1969) de que a estimulação da SCP produzia uma analgesia tão profunda em ratos que uma laparotomia poderia ser realizada sem o uso de anestésicos químicos.

Outro trabalho fundamental no entendimento da importância funcional da SCP foi realizado por Nashold e colaboradores (Nashold *et al.*, 1969). Estes autores relataram que a estimulação da SCP em humanos produzia fortes reações emocionais, descritas como sensações de medo e morte iminente, acompanhadas de alterações autonômicas: piloereção, sudorese, aumento da frequência cardíaca e ruborização da face e pescoço. Isso corroborou estudos que demonstraram que a estimulação elétrica de uma região mesencefálica, envolvendo a SCP, pode evocar padrões de comportamento defensivo espécie-específico em diferentes espécies animais (Hunsperger, 1956; Fernandez-de-Molina e Hunsperger, 1959; 1962; Skultety, 1963; Edwards e Flynn, 1972). Uma relação com medo e ansiedade foi posteriormente proposta quando se verificou que tais respostas defensivas, assim como respostas autonômicas evocadas por estimulação elétrica e também química, poderiam ser abolidas ou atenuadas com o uso de ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos (Schenberg e Graeff, 1978; Graeff, 1981; Graeff, 1991).

Muito importantes também foram os estudos com lesão da SCP mostrando que as reações defensivas evocadas pela confrontação com outro animal ou por estimulação do hipotálamo ou da amígdala são eliminadas ou atenuadas drasticamente, sugerindo assim que a região central mesencefálica é uma 'via comum' para a reação de defesa, cuja integridade parece essencial para a coordenação da

reatividade defensiva do animal (Bandler, 1988; Graeff *et al.*, 1988).

Devido à importância e complexidade da SCP, várias foram as tentativas de realizar uma divisão funcional dessa estrutura. A idéia de heterogeneidade surgiu baseando-se primeiramente em estudos anatômicos (Hamilton, 1973; Mantyh, 1982a; 1982b; Beitz, 1985; Conti *et al.*, 1988). Foram sugeridas algumas subdivisões para a SCP, geralmente destacando diferenças na dimensão dorsoventral e mediolateral e, basicamente ignorando a organização rostrocaudal da SCP (para revisão ver Beitz, 1995).

Em 1991, Bandler e colaboradores (Bandler *et al.*, 1991a; 1991b) sugeriram que a especificidade anatômica e funcional da SCP poderia apresentar-se na forma de colunas neuronais longitudinais, organizadas ao longo do seu eixo rostrocaudal (Fig.1). Segundo esses autores, pode-se encontrar 4 colunas longitudinais distintas, distribuídas de maneira radial na SCP: lateral, ventrolateral, dorsomedial e dorsolateral. Estas regiões parecem possuir algumas características distintas entre si, principalmente no que diz respeito à imunorreatividade celular, densidade de receptores, conexões aferentes e eferentes e função (para revisão ver Bandler *et al.*, 1991a). Tal subdivisão mostrou não somente a importância de se levar em consideração todas as dimensões (dorsoventral, mediolateral e rostrocaudal) da SCP (Fig.1), como também suscitou a necessidade de caracterização da área na SCP estudada nos diferentes

laboratórios (Bandler et al., 1985; Beart et al., 1988; Bandler e Depaulis, 1991; Rizvi et al., 1991; 1992; Bandler e Shipley, 1994; Bandler e Keay, 1996; Chen e Aston-Jones, 1996; Valverde-Navarro et al., 1996; Lonstein e Stern, 1997; Walker et al., 1997; Vander-Horst et al., 1998; Murphy et al., 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Adamec, 2001; Omori et al., 2001).

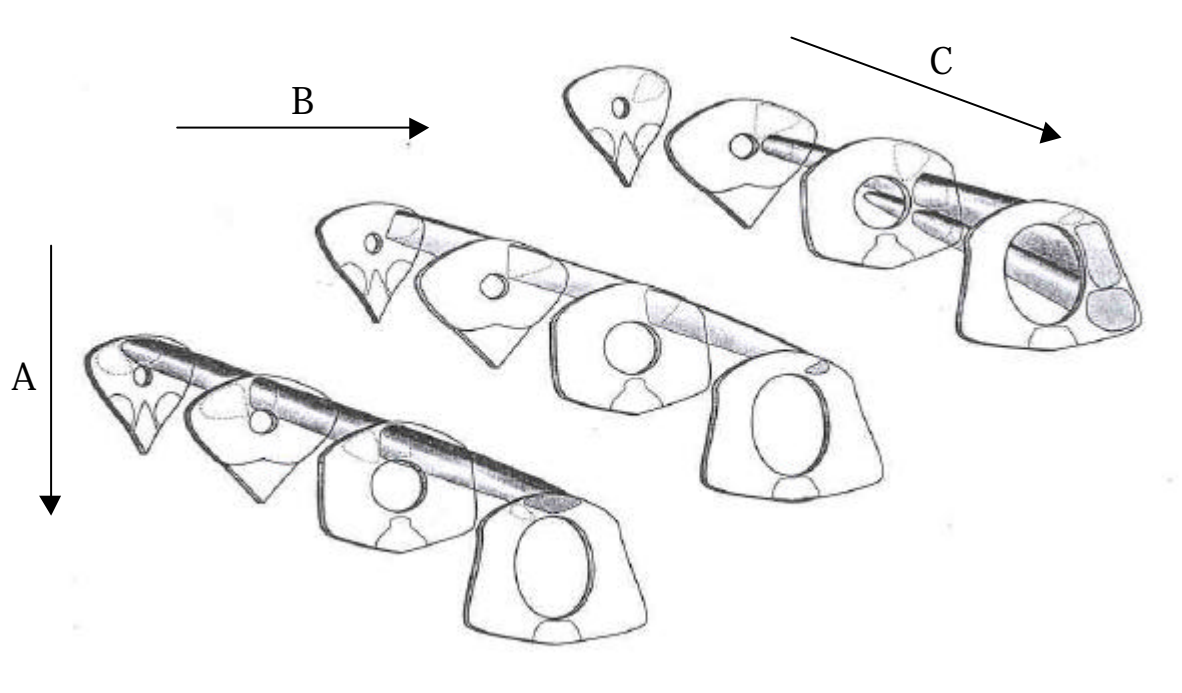


Fig. 1. Esquema ilustrativo da organização colunar das diferentes subdivisões (dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral; da esquerda para direita, respectivamente) ao longo do eixo rostrocaudal da SCP. As flechas indicam as dimensões A) dorsoventral, B) mediolateral e C) rostrocaudal. (Adaptado de Bandler et al., 1991a).

Nosso laboratório tem trabalhado com a porção dorsal da SCP (SCPd), que compreende as colunas dorsomedial e dorsolateral descritas por Bandler e colaboradores (Bandler et al., 1991a; 1991b), desde 1983 (Carobrez et al., 1983).

A SCPd parece possuir um conjunto de aferentes e eferentes bastante especial, possuindo conexões recíprocas com diferentes áreas prosencefálicas (Krieger *et al.*, 1979; Beitz, 1982; Meller e Dennis, 1986; Beart *et al.*, 1988; Rizvi *et al.*, 1991; 1992; Canteras e Swanson, 1992; Cameron *et al.*, 1995) e com áreas do tronco cerebral (Beitz, 1982; Holstege, 1991; Redgrave e Dean, 1991). Em particular, a SCPd possui conexões intrínsecas com outras subdivisões da SCP (Sandkuhler e Herdegen, 1995; Jansen *et al.*, 1998).

Essa interconectividade diversa, mantém a SCPd em conexão com diferentes estruturas relacionadas ao sistema motor, sensorial, límbico e autonômico (Beitz, 1982) e é o que provavelmente possibilita a participação desta porção da SCP na mediação do comportamento defensivo.

Muitas das reações defensivas mediadas pela SCP foram primeiramente desencadeadas por estimulação elétrica (Skultety, 1963; Nashold *et al.*, 1969; Pfaff *et al.*, 1973; Bovier *et al.*, 1982; Mos *et al.*, 1982). Conseqüentemente, pode-se dizer que a estimulação elétrica teve um papel importante na avaliação da resposta defensiva mediada pela SCP. Porém, essa técnica apresentava um grande inconveniente, que era o fato de a corrente elétrica excitar tanto corpos neuronais como também axônios de passagem, o que dificultava a localização exata dos neurônios envolvidos na mediação dos possíveis comportamentos defensivos (Ranck, 1975).

Goodchild e colaboradores (Goodchild *et al.*, 1982)

sugeriram que o uso de estimulação química por aminoácidos excitatórios (AAE) poderia evitar esse problema, pois tal estimulação excita seletivamente corpos celulares e seus processos dendríticos, mas não fibras de passagens.

1.2. Participação dos AAE no Comportamento Defensivo

Dentre os AAE, o glutamato (GLU) é considerado o neurotransmissor mais importante nos circuitos do Sistema Nervoso Central (SNC; Watkins e Evans, 1981). O GLU pode exercer muitos papéis centrais, atuando em diversos receptores específicos amplamente distribuídos pelo SNC (Collingridge e Lester, 1989). Estes receptores são divididos em duas grandes classes: os metabotrópicos e os ionotrópicos (Hollmann e Heinemann, 1994). Os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G e também representam alvos da ação do glutamato no SNC (Monaghan et al., 1989). Os receptores ionotrópicos dividem-se em duas principais categorias, os do tipo NMDA, para os quais o análogo sintético do glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) é um potente estimulador, e os do tipo não-NMDA, nos quais tal análogo não é ativo (Leeson e Iversen, 1994). Dentre os receptores glutamatérgicos, pela existência de antagonistas altamente seletivos e farmacologia única, o subtipo NMDA suscita muito interesse (Leeson, 1993; Danysz e Parson, 1998).

O receptor NMDA convencional (Fig.2) é formado por quatro subunidades heteroméricas (Danysz e Parson, 1998) e,

quando ativado controla a abertura de um canal iônico que permite a entrada de cátions monovalentes (principalmente sódio) e divalentes (principalmente cálcio) nas células alvos (Leeson e Iversen, 1994). Uma característica pouco comum desse receptor é que, em estado de repouso, seu canal iônico associado está completamente bloqueado por íons magnésio. No entanto, esse bloqueio é dependente de voltagem e é removido se a célula for parcialmente despolarizada por ativação dos receptores não-NMDA ou por outras intervenções excitatórias (Leeson e Iversen, 1994).

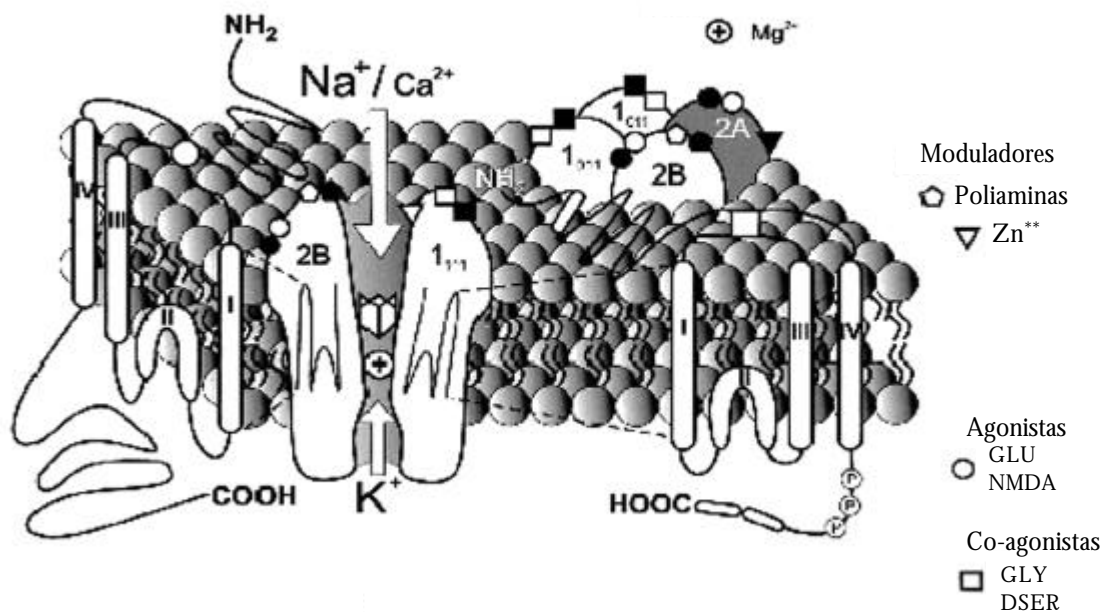


Fig.2. Esquema ilustrativo do receptor NMDA, com seus diversos sítios de ligação. DSER: D-serina; GLU: glutamato; GLY: glicina; NMDA: n-metil-D-aspartato (Adaptado de Danysz e Parson, 1998).

Outra característica interessante é que esse receptor possui diversos sítios de ligação regulatórios, tidos como alvos potenciais para ação de drogas. Além do sítio de ligação para o GLU, há um sítio de reconhecimento para o magnésio, um para o zinco, um para as poliaminas e outro sítio que reconhece concentrações submicromolares do aminoácido glicina (GLY; Leeson e Iversen, 1994). A GLY é um neurotransmissor com papel duplo no SNC, exercendo efeito inibitório em receptores sensíveis à estricnina (receptor GLY_A), presentes principalmente na medula (Delorey e Olsen, 1989; McGeer e McGeer, 1989) e efeito estimulatório no receptor NMDA onde atua como "co-agonista" deste complexo-receptor (Kemp e Leeson, 1993; Leeson e Iversen, 1994). É interessante salientar que o sítio de ligação para a GLY acoplado ao receptor NMDA (GLY_B) é insensível à estricnina (Thomson, 1990).

Alguns pesquisadores propõem que o nível endógeno de GLY é suficiente para saturar completamente o sítio GLY_B acoplado ao receptor NMDA (Schell *et al.*, 1997). Porém um número substancial de autores defendem que esses sítios não estão sempre saturados (Czepita *et al.*, 1996; Wilcox *et al.*, 1996), dado que a GLY exógena, ou ainda a D-serina (DSER) exógena, também agonista desse sítio, potencia respostas do NMDA *in vivo* (Salt, 1989; Wood *et al.*, 1989; Thiels *et al.*, 1992). Em adição, a GLY é capaz de induzir respostas aversivas quando microinjetada na SCPd (Schmitt *et al.*, 1995; Teixeira e Carobrez, 1999) e de alterar o efeito de

compostos benzodiazepínicos injetados pela via sistêmica (De-Souza *et al.*, 1997).

Para que o receptor NMDA seja funcional, deve haver a combinação de pelo menos uma subunidade NR1 com uma subunidade NR2, as quais expressam os sítios de reconhecimento para a GLY e para o GLU, respectivamente. Receptores contendo a subunidade NR2A exibem afinidade reduzida pela GLY quando comparados com outros receptores sem esta subunidade (para revisão ver Danysz e Parson, 1998; Dingledine *et al.*, 1999). As subunidades NR2A e NR2B parecem regular a abertura do canal (Monyer *et al.*, 1992). A combinação NR1-NR2B aparenta exibir o maior potencial de ação (Monyer *et al.*, 1994), o que permite uma janela de tempo mais longa para a "detecção de coincidência", fenômeno que envolve a detecção de eventos sincronizados e relacionados entre si, importante para a função do receptor NMDA (Tsien, 2000; Da-Rocha *et al.*, 2001).

Estudos recentes apontam a existência de uma terceira subunidade do receptor NMDA (NR3). Esta subunidade parece conter um sítio de ligação para a GLY, cuja ativação desencadeia ações excitatórias diferentes do NMDA convencional (NR1/NR2), mas ainda pouco compreendidas (Chatterton *et al.*, 2002).

O complexo-receptor NMDA está envolvido em muitos processos funcionais, tais como: memória e aprendizado (Morris, 1989), desenvolvimento neuronal e plasticidade sináptica (Cotman *et al.*, 1988), excitotoxicidade neuronal

conseqüente de isquemia e hipoglicemia (McCulloch, 1992), epilepsia e outros transtornos neurodegenerativos (Meldrum, 1985), dependência e tolerância química (Marek *et al.*, 1991; Rossetti e Carboni, 1995), dor neuropática (Eisenberg e Pud, 1998) e distúrbios afetivos, como a ansiedade e a depressão (Matheus *et al.*, 1994; Maes *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, estudos comportamentais sobre a reação defensiva destacam o envolvimento do receptor NMDA na mediação desses comportamentos. Injeções sistêmicas de antagonistas competitivos ou não competitivos têm mostrado efeitos do tipo ansiolítico em diversos modelos animais de ansiedade (Stephens *et al.*, 1986; Bennett e Amrick, 1987; Porter *et al.*, 1989; Kehne *et al.*, 1991; Blanchard *et al.*, 1992). De maneira similar, injeções sistêmicas de antagonistas do receptor GLY_B acoplado ao NMDA, também têm exibido perfil ansiolítico (Trullas *et al.*, 1989; Corbett e Dunn, 1991; Anthony e Newins, 1993).

De modo complementar, alguns estudos revelam que os neurônios da SCPd expressam receptores NMDA/GLY_B (Albin *et al.*, 1990; Tolle *et al.*, 1993). Assim, a estimulação química, com a aplicação direta cerebral de AAE, ou ainda outras drogas que atuam no receptor NMDA/GLY_B, permitem o estudo do papel da ativação deste complexo-receptor nas reações de defesa (comportamentais e cardiovasculares) mediadas pela SCPd (Krieger e Graeff, 1985; Bandler, 1988; Batista-da-Silva *et al.*, 1990; Bandler e Depaulis, 1991; Schenberg *et al.*, 2001).

1.3. O Labirinto em Cruz Elevado como modelo para estudar comportamento defensivo

Os modelos animais de ansiedade têm sido amplamente utilizados para estudar o comportamento de defesa, os diferentes sistemas de neurotransmissão e as diferentes estruturas neurais envolvidas nesse comportamento (Griebel, 1995; Walker e Davis, 1997; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Adamec, 2001).

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um dos mais populares modelos de ansiedade. Este modelo deriva do trabalho de Montgomery (1955) sobre a relação entre o medo e a motivação exploratória nos ratos, e baseia-se na seguinte premissa: um ambiente novo pode gerar tanto curiosidade quanto medo, criando portanto, um típico conflito "aproximação-esquiva". O LCE consiste de quatro braços, dois braços abertos opostos a dois braços fechados, elevados do chão. A resposta de esquiva aos braços abertos é concordante com a idéia de que estas áreas evocam reação de medo maior que a provocada pelos braços fechados. Assim, as proporções das atividades (frequência de entradas e tempo) nos braços abertos do LCE são tidas como índices tradicionais de ansiedade (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985).

Uma característica marcante do LCE é ser um modelo capaz de evocar aversão/medo *per se*. Os principais argumentos para essa proposição são: 1) aversão aos braços abertos do labirinto (Pellow *et al.*, 1985); 2) medo

aprendido, sem habituação (Treit *et al.*, 1993; Bertoglio e Carobrez, 2000); 3) aumento do corticosterona plasmático (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers *et al.*, 1999); e 4) analgesia bloqueada por ansiolíticos (Lee e Rodgers, 1990). Em adição, estudos imunohistoquímicos evidenciam uma possível relação entre os comportamentos evocados no LCE, comportamentos de medo/defesa e estruturas cerebrais ativadas. Expressão aumentada de Fos na SCP foi detectada após a exposição ao LCE (Silveira *et al.*, 1993), a um predador (Canteras e Goto, 1999), ao odor de um predador (Dielenberg *et al.*, 2001), ao som ultrasônico aversivo (Beckett *et al.*, 1997), durante sobressalto acústico potenciado pelo medo ("Startle") (Campeau *et al.*, 1997), e como resultado de injeção sistêmica de drogas ansiogênicas (Singewald e Sharp, 2000).

Nos últimos anos, a análise dos índices tradicionais de ansiedade no LCE tem sido uma ferramenta útil na avaliação dos efeitos ansiogênicos e ansiolíticos de muitas drogas (File, 1992; Russo *et al.*, 1992; Handley e MacBlane, 1993; Treit *et al.*, 1993; Rodgers e Cole, 1994; De-Souza *et al.*, 1997). Estudos recentes indicam que a sensibilidade do modelo pode ainda ser incrementada adotando-se uma abordagem mais detalhada, que inclua a análise de parâmetros etológicos (posturas defensivas, reações de congelamento, comportamento de avaliação de risco e esquiva) ou também análise minuto-a-minuto do perfil comportamental do animal durante a exposição ao LCE (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002). Outro item a ser

considerado é o efeito da experiência prévia no LCE. Algumas pesquisas revelam que uma exposição ao LCE é suficiente para afetar as respostas comportamentais e farmacológicas de roedores numa segunda exposição ao mesmo labirinto (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000), isso porque o medo ou a ansiedade gerados pela exposição inicial ao LCE parecem ser do tipo incondicionado, enquanto na segunda exposição o medo parece ser condicionado (File e Zangrossi, 1993; File *et al.*, 1996) e adquirido ao longo dos minutos da primeira exposição (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002).

1.4. Participação dos receptores NMDA/GLY_B da SCPd na modulação do comportamento defensivo

A observação de que a estimulação da SCPd produz aversão em animais e medo/ansiedade em humanos foi um eficiente indicador de que essa região é um importante elo no circuito cerebral processador do medo e da ansiedade (Behbehani, 1995). Vários trabalhos foram feitos sobre o assunto, e o estudo sobre a resposta aversiva produzida por estimulação elétrica e química da SCPd (Bandler *et al.*, 1985; Bandler, 1988; Graeff *et al.*, 1988; Bandler e Depaulis, 1991) vem contribuindo para um maior entendimento dos processos aversivos, possivelmente ansiedade e suas bases farmacológicas (Graeff *et al.*, 1993).

O papel da neurotransmissão pelos AAE na SCPd vem sendo sistematicamente estudado, utilizando o LCE como modelo

experimental (Schmitt *et al.*, 1990; Guimarães *et al.*, 1991; Matheus *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1995; De-Souza *et al.*, 1997; Teixeira e Carobrez, 1999).

Alguns resultados indicam que a GLY e a DSER microinjetadas na SCPd apresentam efeito ansiogênico (Schmitt *et al.*, 1995) e o ácido 7-cloroquinurênico ou o (\pm)-3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona (HA966), antagonistas do sítio GLY_B provocam efeito ansiolítico (Matheus *et al.*, 1994).

A partir de relatos na literatura sobre a participação diferenciada de áreas rostrais e caudais da SCPd na mediação do comportamento defensivo (Bandler *et al.*, 1985; Bandler e Depaulis, 1991), a possibilidade de que compostos ligantes do sítio GLY_B aplicados a diferentes subdivisões ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd pudessem evocar padrões distintos de comportamento foi testada. Para tanto, GLY ou HA966 foram microinjetados em 3 diferentes subdivisões (rostral, intermediária e caudal) da SCPd (Teixeira e Carobrez, 1999). O HA966 produziu efeito ansiolítico consistente e seletivo nas 3 áreas da SCPd estudadas, sugerindo a participação do receptor NMDA/GLY_B ao longo do eixo desta estrutura neural na mediação do comportamento defensivo. A GLY mostrou efeito ansiogênico nas doses de 80 e 120 nmol, restrito à porção caudal da SCPd. Para justificar esse efeito dependente da dose e do sítio da microinjeção da GLY, duas principais hipóteses foram levantadas: diferenças rostrocaudais na

modulação por parte dos transportadores de GLY, responsáveis pela sua recaptação (Berger *et al.*, 1998) e/ou diferenças na saturação dos receptores GLY_B na membrana pós-sináptica (Czepita *et al.*, 1996; Wilcox *et al.*, 1996), tornando-os menos responsivos à GLY exógena. No entanto, tais hipóteses somente poderiam ser confirmadas com estudos eletrofisiológicos ou imunohistoquímicos.

Das considerações feitas até o presente momento, algumas podem ser destacadas:

1. A SCP não é uma estrutura homogênea e pode apresentar diferenças quanto à imunorreatividade celular, densidade de receptores, conexões aferentes e eferentes e funções;
2. O comportamento defensivo evocado por estimulação química com AAE pode apresentar diferenças ao longo do eixo rostrocaudal da SCP;
3. Os receptores NMDA/GLY_B da porção dorsal da SCP parecem participar na mediação do comportamento defensivo;
4. O LCE pode ser uma ferramenta útil para o estudo da participação da SCPd nas respostas de defesa, medo e ansiedade;
5. A microinjeção de GLY na SCPd pode afetar de maneira diferenciada o comportamento dos animais testados no LCE.

2.OBJETIVOS

Tendo em mente que a SCPd é uma das estruturas cerebrais cujos neurônios são ativados após exposição ao LCE (Silveira *et al.*, 1993) e que dados da literatura indicam que o re-teste no LCE pode ser um modelo útil para estudar respostas aprendidas de medo (File *et al.*, 1996), nos propusemos a avaliar a participação de áreas rostrais e caudais da SCPd na modulação das respostas comportamentais observadas em ratos submetidos a duas exposições (teste/re-teste) no LCE. Para tanto, pretendemos utilizar a técnica de inativação reversível e temporária com lidocaína durante o teste e observar as consequências comportamentais em ratos submetidos ao re-teste no LCE.

Em uma etapa subsequente, pretendemos avaliar as respostas comportamentais de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE após estimulação química com diferentes agonistas do receptor NMDA/GLY_B. Sendo que um ponto importante destacado na introdução foi a possibilidade de reações defensivas qualitativamente diferentes ao longo do eixo rostrocaudal da SCP (Bandler *et al.*, 1985; Bandler e Depaulis, 1991; Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez *et al.*, 2001), no presente trabalho avaliaremos os efeitos desta estimulação química em áreas rostrais e caudais da SCPd, e suas implicações para o estudo do comportamento defensivo, reações de medo e, possivelmente ansiedade.

3. PROCEDIMENTOS GERAIS

Considerações Éticas

O presente trabalho envolveu procedimentos experimentais que estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociência. Em adição, procuramos utilizar um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos.

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos, com 4 meses de idade, pesando entre 300 e 400 g. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas (15 x 36 x 30 cm), em duplas. Durante todo o período de permanência no biotério os animais tiveram livre acesso a água e comida, e foram mantidos em ambiente com temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz (12 h claro/escuro) controlados.

No decorrer deste trabalho, houve perda de cerca de 20% dos animais utilizados. Os resultados apresentados aqui referem-se aos 392 animais que tiveram sítios da SCPd atingidos pelos compostos estudados e que foram comprovados após análise histológica, como pode ser visto na Fig.3.

3.2. Cirurgia Estereotáxica

Cada animal foi anestesiado com uma solução combinada (1:1) de xilazina (Rompum®) e quetamina (Francotar®); 1,5

ml/Kg, por via intraperitoneal (I.P.). Uma vez verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se à tricotomia de toda a parte superior da cabeça do animal.

Após a adaptação do animal ao aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA), realizou-se a assepsia da área desejada com álcool iodado. Injetou-se então, uma solução de xilocaína com adrenalina (2%) subcutânea, visando a formação de uma pápula, que não só tinha efeito anestésico local e vasoconstritor, como também orientou na retirada de uma pequena área ovalada de pele. Em seguida, realizou-se a raspagem do perióstio, deixando a calota craniana exposta e permitindo a visualização da sutura lambdóide e da coronária. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados em um mesmo plano horizontal. O osso foi novamente seco e a calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula-guia. Um dos parafusos foi colocado na parte superior do osso parietal esquerdo e o outro no centro do osso parietal direito. Para o implante da cânula na SCPd, as coordenadas obedecidas, segundo Paxinos e Watson (1998), foram as seguintes: AP = -5,8 e -7,6 mm, em relação ao bregma (coordenadas estas subentendidas como rostral e caudal respectivamente), ML = 1,9 mm e DL = 2,0 mm a partir da superfície externa do osso craniano, em um ângulo de 22°.

Na literatura, informações a respeito da difusão de AAE

são dadas em um trabalho de Bandler e colaboradores, onde é citado que no volume de 0,2 μ l a difusão dos AAE não deve passar de 1,0-2,0 mm de diâmetro (Bandler *et al.*, 1985). Conseqüentemente o raio seria a metade destes valores a partir do sítio da injeção, ou seja, 0,5-1,0 mm. Aceitando-se a difusão como sendo diretamente proporcional ao volume, tanto como dependente do tempo de injeção, a microinjeção de um volume de 0,3 μ l possivelmente alcança uma distância de cerca de 0,75-1,5 mm a partir do sítio da injeção. Esta distância é menor do que a existente entre as porções rostral e caudal, porém não menor que a distância entre estas e a porção intermediária (Teixeira e Carobrez, 1999). Baseando-se nesses fatos, optamos por trabalhar somente com áreas rostrais e caudais, pois consideramos os resultados obtidos nestas porções mais fidedígnos, enquanto que na porção intermediária existe maior possibilidade de difusão.

Uma vez adaptados, os parafusos e a cânula, novamente o osso foi seco e a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico auto-polimerizável que, ao endurecer, incorporou todas as peças em uma sólida prótese. Decorridos alguns minutos para a secagem total desta, um mandril nº 30 foi adaptado à cânula, com o intuito de prevenir o seu entupimento. Nova camada de acrílico foi acrescentada e um número foi colocado na prótese acrílica para identificação do animal.

Após a cirurgia cada animal foi colocado numa caixa

específica para a recuperação, dotada de uma lâmpada de 40 W para evitar a hipotermia conseqüente à anestesia geral. Posteriormente os animais foram colocados aos pares em gaiolas, com livre acesso à água e comida, onde permaneceram por 1-2 semanas, até o dia do experimento.

3.3. Cânulas

As cânulas-guias implantadas a fim de possibilitar as microinjeções na SCPd foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm. Com o auxílio do paquímetro (Mitutoyo - Brasil) as cânulas foram cortadas no comprimento de 13 mm. Cada cânula possuía um anteparo (próprio da agulha utilizada), o qual não permitia sua total introdução pelo orifício feito previamente com a broca odontológica.

3.4. Microinjeção Intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 16,8 e 16,2 mm para as porções rostral e caudal respectivamente (0,3 mm de diâmetro), confeccionadas a partir de agulhas odontológicas, conectadas, por um tubo de polietileno, à microseringa (Hamilton, 5 µl). As seringas foram preenchidas com água destilada e a solução a ser injetada, separadas por uma bolha de ar. As agulhas possuíam 3,8 e 3,2 mm a mais que a cânula-guia de maneira que as drogas fossem realmente microinjetadas na SCPd.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado e foi retirado o mandril adaptado à cânula durante o ato cirúrgico. Com o auxílio de limas odontológicas, cortadas de maneira a não ultrapassar 13 mm de comprimento, a cânula-guia foi limpa. Posteriormente, a agulha foi introduzida através da cânula. Em cada animal foi injetado 0,3 µl de solução, em 20 segundos. Em seguida, o animal permaneceu na sua gaiola por cerca de 5 minutos.

3.5. Teste Comportamental

O teste comportamental utilizado foi o LCE. Esse modelo foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) a partir do trabalho de Montgomery (1955). Posteriormente, Pellow e colaboradores (Pellow *et al.*, 1985) forneceram validação comportamental, fisiológica e farmacológica do LCE para ratos.

Esse equipamento, em forma de cruz, elevado 50 cm do chão, é composto por dois braços fechados por paredes (50x10x40 cm) e dois braços abertos (50x10 cm), opostos entre si, sendo que tais braços abertos são circundados por um anteparo de acrílico (1 cm de altura) para evitar a queda dos animais.

Uma arena quadrada (60x60x35 cm), confeccionada igualmente em madeira, foi utilizada imediatamente antes do teste no LCE, com o intuito de aumentar a atividade locomotora, bem como dar ao animal chance de se habituar a

pouca luminosidade (Lister, 1987).

Estes equipamentos utilizados nos experimentos estavam localizados numa sala com luz amarela, cuja intensidade não ultrapassava 44 lux. Após o teste de cada animal, os equipamentos foram limpos com solução de etanol 10 %.

3.6. Protocolo Experimental

O trabalho teve 3 etapas. Em cada etapa os animais foram submetidos ao teste e re-teste no LCE, durante 5 minutos cada, em dois dias seguidos. As duas exposições ao LCE foram videogravadas para transcrição posterior.

Na etapa I, foram avaliados os efeitos da microinjeção de lidocaína em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos.

Na etapa II, foram avaliados os efeitos da microinjeção de GLU e da combinação de GLY e GLU em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos.

Na etapa III, foram avaliados os efeitos da microinjeção de agonistas seletivos para o complexo receptor NMDA/GLY_B (NMDA, GLY e DSER) em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos.

Os animais foram alojados aos pares, por no mínimo 5 dias após a implante das cânulas-guias. No dia do teste o animal era transferido isoladamente para uma ante-sala onde permanecia por cerca de 15 minutos. Em seguida, era transferido para a sala do teste, onde era microinjetado com uma das seguintes soluções:

a. líquido artificial;

- b. lidocaína (4%);
- c. GLU (20 e 40 nmol);
- d. GLY (120 nmol) + GLU (20 ou 40 nmol);
- e. NMDA (25, 50 e 100 pmol)
- f. GLY (120 e 180 nmol);
- g. DSER (160 e 320 nmol);

Após a microinjeção, o animal era recolocado na sua gaiola onde permanecia por cerca de 5 minutos. A seguir, o animal era colocado na arena de madeira, onde ficava por 5 minutos. Passado este tempo, o animal era transferido para a plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento registrado com uma câmera de vídeo por um período de 5 min, de acordo com o procedimento descrito por Pellow e colaboradores (Pellow *et al.*, 1985). Após cada sessão experimental, o LCE era limpo, assim como a arena de madeira, com uma solução de etanol 10%. 24 horas após, os diferentes grupos foram novamente submetidos ao LCE por 5 min, sem administração de drogas. Assim, os animais receberam a microinjeção (com o controle ou com os diferentes compostos) antes do teste no LCE e, no re-teste (24 h após), os diferentes grupos foram submetidos ao LCE sem administração de drogas.

É interessante salientar que os grupos experimentais e os controles foram realizados em paralelo; todos os experimentos foram realizados entre 8 e 13 h e as doses foram selecionadas de acordo com a literatura (Batista-da-Silva *et al.*, 1990; Matheus *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*,

1995; File *et al.*, 1998; Teixeira e Carobrez, 1999).

Após os experimentos, os registros em vídeos foram transcritos e os comportamentos anotados minuto a minuto.

3.7. Dispositivo de Registro comportamental

Os parâmetros comportamentais observados minuto a minuto durante o teste e o re-teste foram:

- Frequência de entradas dos animais nos braços abertos e no braços fechados do labirinto (FBF);
- Tempo de permanência dos animais nos braços abertos e nos braços fechados do labirinto;
- Frequência de tentativas de entradas no braços abertos (FT), sendo considerado tentativa, o ato do animal colocar até 3 patas em um dos braços abertos, seguida de retração a posição original. Este parâmetro parece estar relacionado a comportamento de avaliação de risco (Bertoglio e Carobrez, 2000).

Posteriormente, calculou-se:

- a) índices tradicionais de ansiedade: a porcentagem de frequência de entrada nos braços abertos em relação a frequência total de entrada em qualquer um dos braços (%FEA) e a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos em relação a permanência total nos braços (%TPA), durante os 5 minutos de exposição ao LCE.
- b) tempo de permanência na plataforma central (TPC), que é o tempo total do experimento (300 s) menos o tempo de permanência nos braços. Alguns autores sugerem que o TPC

corresponde ao tempo de tomada de decisão e que de uma certa maneira pode fornecer informação sobre o conflito esquiva/aproximação desencadeado pela configuração do labirinto (Lee e Rodgers, 1990).

De maneira complementar, foi feita uma análise minuto-a-minuto da %TPA visando fornecer uma avaliação temporal do comportamento de esquiva e traçar um panorama geral sobre o perfil comportamental de ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

3.8. Histologia

Após o teste comportamental, os animais foram novamente anestesiados com a combinação anestésica descrita no item 3.2, por via intraperitonal (I.P.) e perfundidos, via intracardíaca, com solução salina (NaCl, 0,9%), seguida por solução de formaldeído (10%).

Posteriormente, foram decapitados e receberam uma microinjeção de solução de Azul de Evans (0,20 µl). Seguiu-se a remoção dos cérebros, que foram acondicionados em solução de formaldeído (10%), por um mínimo de 3 dias. Os cérebros foram fatiados em um micrótomo de congelamento. Os sítios das injeções foram identificados através da comparação do corte com o diagrama do atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998).

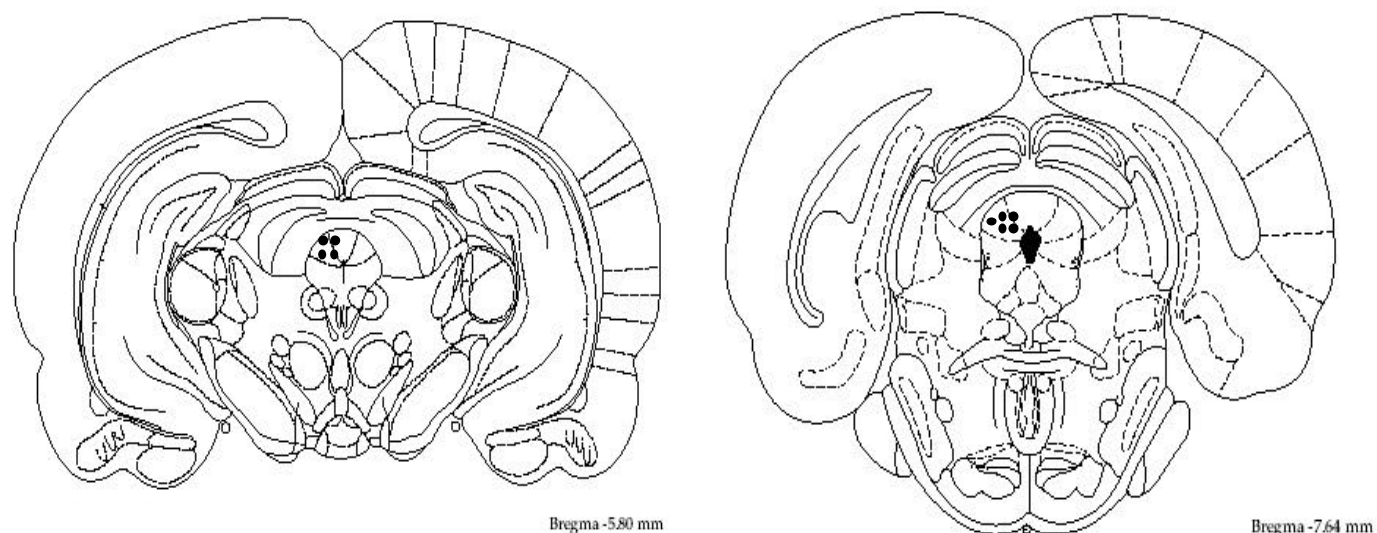


Fig. 2. Diagramas de cortes mesencefálicos coronais do cérebro de rato, ilustrando os sítios das microinjeções, marcados com Azul de Evans, nas porções rostral e caudal da SCPd. Os sítios são em número reduzido, devido a sobreposição dos mesmos (Adaptado de Paxinos e Watson, 1998).

3.9. Análise Estatística

Os dados do teste e re-teste (sessões de 5 minutos), expressos como média \pm epm, foram inicialmente submetidos ao teste uni-variado de Bartlett, para a verificação de homogeneidade das variâncias. Na ocorrência de valores não homogêneos ($p < 0,05$), os dados foram transformados pela raiz quadrada, com o objetivo de homogeneizar a amostra.

Todos os parâmetros estudados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) de duas vias. O tratamento e o teste/re-teste ou minuto-a-minuto (medida repetida) foram considerados como variáveis independentes, os parâmetros comportamentais observados foram considerados como variáveis dependentes e a posição (rostral ou caudal) e a histologia (positiva) foram consideradas condições.

Valores significativos de tratamento e teste/re-teste (ou minuto-a-minuto) indicados pela ANOVA foram submetidos posteriormente ao teste *post hoc* LSD (Least Square Difference), de comparação combinada. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Nos dados referentes a análise das sessões de 5 minutos, foram feitas as seguintes comparações:

- a) grupo controle X grupo lidocaína no teste e no re-teste;
- b) grupo controle no teste X no re-teste;
- c) grupo lidocaína no teste X no re-teste.

Na análise minuto-a-minuto do teste e re-teste, foram feitas diversas comparações e destacadas as diferenças relevantes nos gráficos.

3.10. Drogas e Soluções

Nos experimentos realizados as seguintes drogas foram utilizadas:

- Anestésico geral para aplicação IP: solução combinada 1:1 de xilazina (Rompum®, Bayer S.A., Brasil) e quetamina (Francotar®, Virbac do Brasil).

- Para aplicação intracerebral:

a) líquido artificial, com a seguinte constituição: KCl 2,5 mM, NaCl 125 mM, MgCl₂ 1,18 mM e CaCl₂ 1,26 mM (Richards *et al.*, 1995); b) lidocaína (RBI, EUA), c) GLU (Sigma, EUA), d) GLY (Sigma, EUA), e) NMDA (Sigma, EUA), f) DSER (RBI, EUA), dissolvidos em líquido; e g) Azul de Evans - corante histológico (Sigma, EUA), dissolvido em água destilada.

4. ETAPAS EXPERIMENTAIS

4.A. ETAPA I. Efeito da inativação temporária e reversível da SCPd sobre os comportamentos observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

Em muitas espécies animais, a estimulação elétrica e química da SCPd evoca comportamentos defensivos (Graeff, 1981; Bandler, 1988) juntamente com respostas neurovegetativas (Schenberg e Graeff, 1978; Hilton, 1982; Carobrez *et al.*, 1983). Estas reações parecem ser moduladas por diversos neurotransmissores, tais como: acetilcolina (Carrive *et al.*, 1986), serotonina (Graeff, 1993), GABA (Schenberg *et al.*, 1981), opióides (Fedynyshyn *et al.*, 1989) e AAE (Guimarães *et al.*, 1991; Schmitt *et al.*, 1990; Bandler e Depaulis, 1991; Matheus *et al.*, 1994).

Para o estudo dos comportamentos defensivos, dos diferentes sistemas de neurotransmissão e das estruturas neurais envolvidas nestas respostas, muitos modelos animais de ansiedade têm sido utilizados (Griebel, 1995; Menard e Treit, 1999; Teixeira e Carobrez, 1999; Adamec, 2001). A exposição ao LCE tem sido um dos testes de ansiedade mais populares (Rodgers e Cole, 1994; Rodgers *et al.*, 1997), capaz de detectar variações nas respostas de conflito e esquiva e, conseqüentemente, sensível a drogas ansiogênicas e ansiolíticas (Rodgers e Cole, 1994). Em contrapartida, o re-teste no LCE ainda carece de validação, isto porque há controvérsias sobre o tipo de medo/ansiedade evocado por uma

segunda exposição neste modelo. Alguns autores sugerem que enquanto os comportamentos de esquiva e conflito evocados no teste representam uma resposta defensiva não-condicionada, esses mesmos comportamentos quando observados no re-teste parecem indicar um tipo de resposta condicionada (File e Zangrossi, 1993; File *et al.*, 1996), adquirida ao longo da primeira exposição (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002).

A microinjeção de anestésicos locais, tais como lidocaína, é uma dos métodos mais utilizados para inativação temporária de estruturas cerebrais, sem dano às estruturas-alvo (Malpeli, 1999). A lidocaína causa um bloqueio reversível da transmissão sináptica e da condutância do estímulo ao longo dos axônios de passagem (Malpeli e Schiller, 1979) e sua microinjeção intracerebral pode ser utilizada para o estudo do envolvimento de estruturas específicas em determinadas situações (Da-Costa-Gomez *et al.*, 1996; File *et al.*, 1998).

4.A.1. OBJETIVO EXPERIMENTAL

A realização deste experimento teve por finalidade a avaliação do papel da SCPd nos comportamentos evocados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

4.A.2. PROCEDIMENTO

Os animais operados nesta etapa (I) receberam uma microinjeção (0,3 µl) de líquido (controle) ou lidocaína (4%) em

áreas rostrais e caudais da SCPd e, procedeu-se como descrito no item 3.6 dos procedimentos gerais.

4.A.3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 4 e 5 e tabelas 1 a 2.

Na Fig.4 estão representados os dados obtidos após a inativação temporária e reversível (com lidocaína) da SCPd rostral e caudal, sobre a atividade nos braços abertos em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.4.A), a ANOVA detectou um efeito na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) referente ao tratamento [$F(1,19)=5,96; p<0,05$ e $F(1,19)=5,19; p<0,05$, respectivamente] e ao teste/re-teste [$F(1,19)=25,34; p<0,05$ e $F(1,19)=22,59; p<0,05$; respectivamente]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de lidocaína na porção rostral não afetou a %FEA e %TBA no teste no LCE. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que confirma dados da literatura (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000) que indicam que numa segunda exposição os animais apresentam menor proporção de atividade nos braços abertos e conseqüentemente uma resposta de esquiva aos braços abertos maior do que no teste. Houve também uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo que recebeu lidocaína no dia anterior, quando comparado com seu valor prévio no teste, mostrando que no re-

teste este grupo apresenta uma resposta de esquiva aos braços abertos maior do que no teste. No entanto, esta resposta não foi tão acentuada quanto a do grupo controle, pois o teste *post hoc* mostrou que as %FEA e %TBA do grupo lidocaína foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que as do grupo controle.

Na SCPd caudal (Fig.4.B), a ANOVA detectou um efeito na atividade nos braços abertos referente ao tratamento [%FBA: $F(1,19)=12,71; p < 0,05$ e %TBA: $F(1,19)=5,01; p < 0,05$] e ao teste/re-teste [%FBA: $F(1,19)=15,39; p < 0,05$; %TBA: $F(1,19)=9,89; p < 0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a microinjeção de lidocaína na porção caudal não afetou a %FEA e %TBA no teste no LCE. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que confirma os resultados da porção rostral e dados da literatura (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000) que indicam que a experiência prévia no labirinto aumenta o medo evocado numa segunda sessão. O teste *post hoc* mostrou que no re-teste, as medidas %FEA e %TBA do grupo lidocaína foram significativamente maiores que as do grupo controle e não foram diferentes do valor do grupo lidocaína no teste.

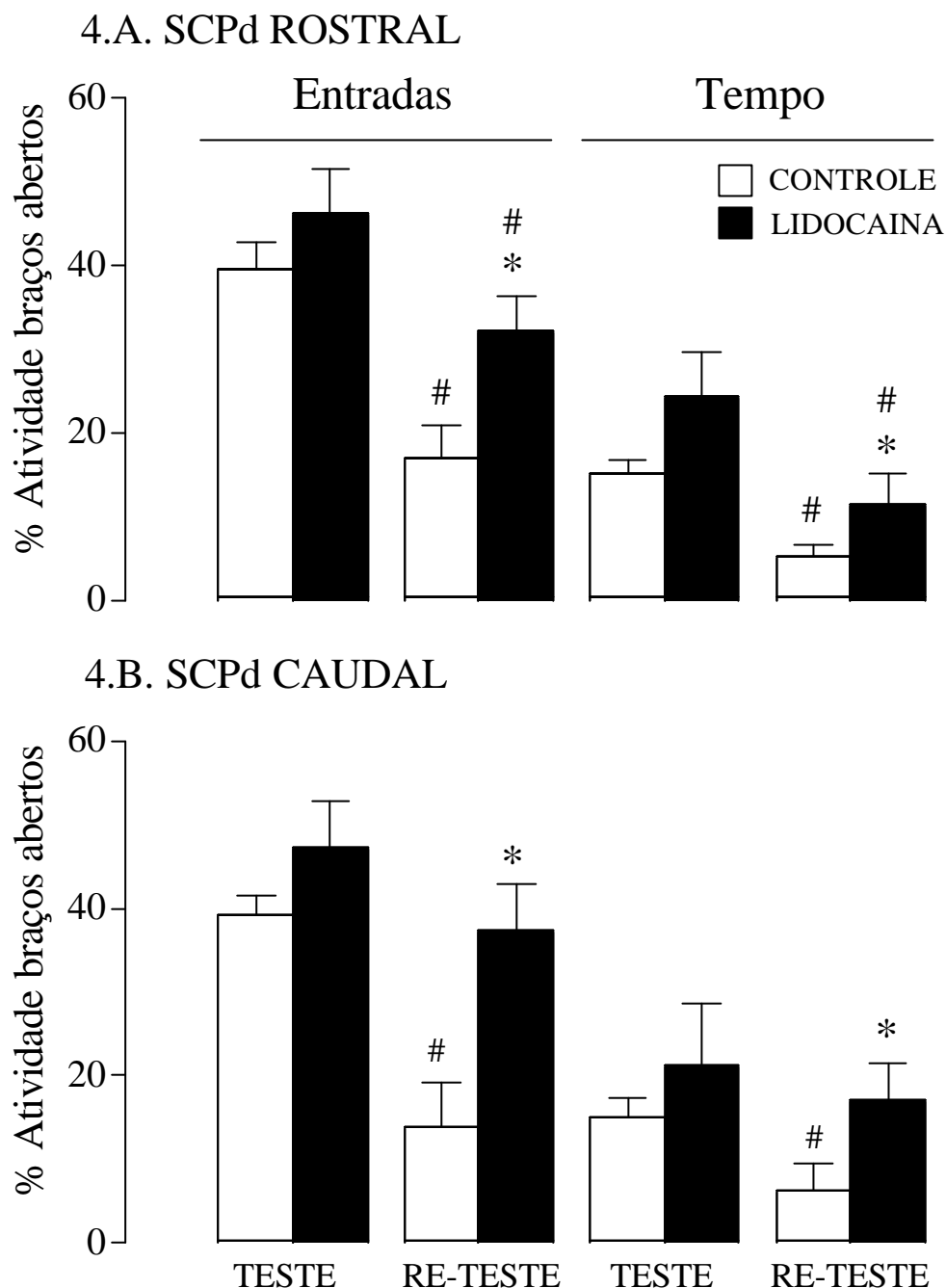


Fig. 4. Efeitos na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) após a inativação de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de lidocaína (n=9, nas duas porções), 15 min antes do teste no LCE, comparada com o grupo controle (n=12, nas duas porções). O re-teste foi realizado 24 h após, sem droga. Os valores estão representados como médias \pm erro padrão da média (epm). * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor do respectivo grupo no teste.

Na Fig.5 podemos observar a %TBA ao longo dos 5 minutos de exposição no teste e no re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.5.A), a ANOVA detectou efeito significativo do tratamento e da exposição minuto-a-minuto [$F(1,19)=4,84; p<0,05$ e $F(9,171)=13,94; p<0,05$, respectivamente] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que para o grupo controle, há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA ao longo dos minutos da exposição-teste (1º minuto diferente do 2º, 3º, 4º e 5º), sugerindo que há uma aquisição gradual da resposta de esquiva aos braços abertos e confirmando dados da literatura (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2002). Para o grupo lidocaína, há também diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA ao longo dos minutos da exposição-teste (1º minuto diferente do 3º, 4º e 5º), sugerindo que há aquisição gradual da resposta de esquiva também para este grupo. No re-teste, o grupo controle não apresenta diferença na %TBA ao longo dos minutos, enquanto que no grupo lidocaína a %TBA é maior ($p<0,05$) no 1º minuto que no 2º, 3º, 4º e 5º. É importante também ressaltar que para o grupo lidocaína, a %TBA no primeiro minuto do re-teste é significativamente maior ($p<0,05$) que no último minuto no teste. Este aumento não ocorre no grupo controle.

Ainda na porção rostral da SCPd, quando comparamos um minuto específico da sessão entre o grupo experimental e controle, podemos notar um aumento significativo ($p<0,05$) na %TBA para o grupo lidocaína no 2º, 3º e 4º minutos do teste. Esse resultado sugere efeito ansiolítico, apesar de que no

dado da sessão total (5 minutos), tal efeito não foi evidenciado. No 1º minuto do re-teste podemos observar que o grupo lidocaína não apresenta retenção da resposta de esquiva.

Na porção caudal da SCPd (Fig.5.B), a ANOVA detectou efeito da exposição minuto-a-minuto [$F(9,171)=11,93;p<0,05$] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA ao longo dos minutos da exposição-teste (1º minuto diferente do 2º, 3º, 4º e 5º) para o grupo controle e para o grupo da lidocaína, sugerindo que há aquisição gradual da resposta de esquiva aos braços abertos do LCE. No re-teste, o grupo controle não apresenta diferença na %TBA ao longo dos minutos, enquanto que no grupo lidocaína a % TBA é maior no 1º minuto que no 4º e 5º. É importante também ressaltar que, para o grupo lidocaína, a %TBA no 1º minuto do re-teste é significativamente maior ($p<0,05$) que no último minuto no teste. Este aumento não ocorre no grupo controle.

Ainda na SCPd caudal, quando comparamos um minuto específico da sessão entre o grupo experimental e controle, podemos notar aumento significativo ($p<0,05$) na %TBA para o grupo lidocaína no 1º minuto do teste e 1º, 2º, 3º minutos do re-teste. Esses resultados parecem indicar que o grupo lidocaína, apesar de apresentar menos aversão aos braços abertos no 1º minuto do teste, mostrou uma curva de aquisição de esquiva. No entanto, no re-teste mostrou prejuízo na retenção da resposta de esquiva.

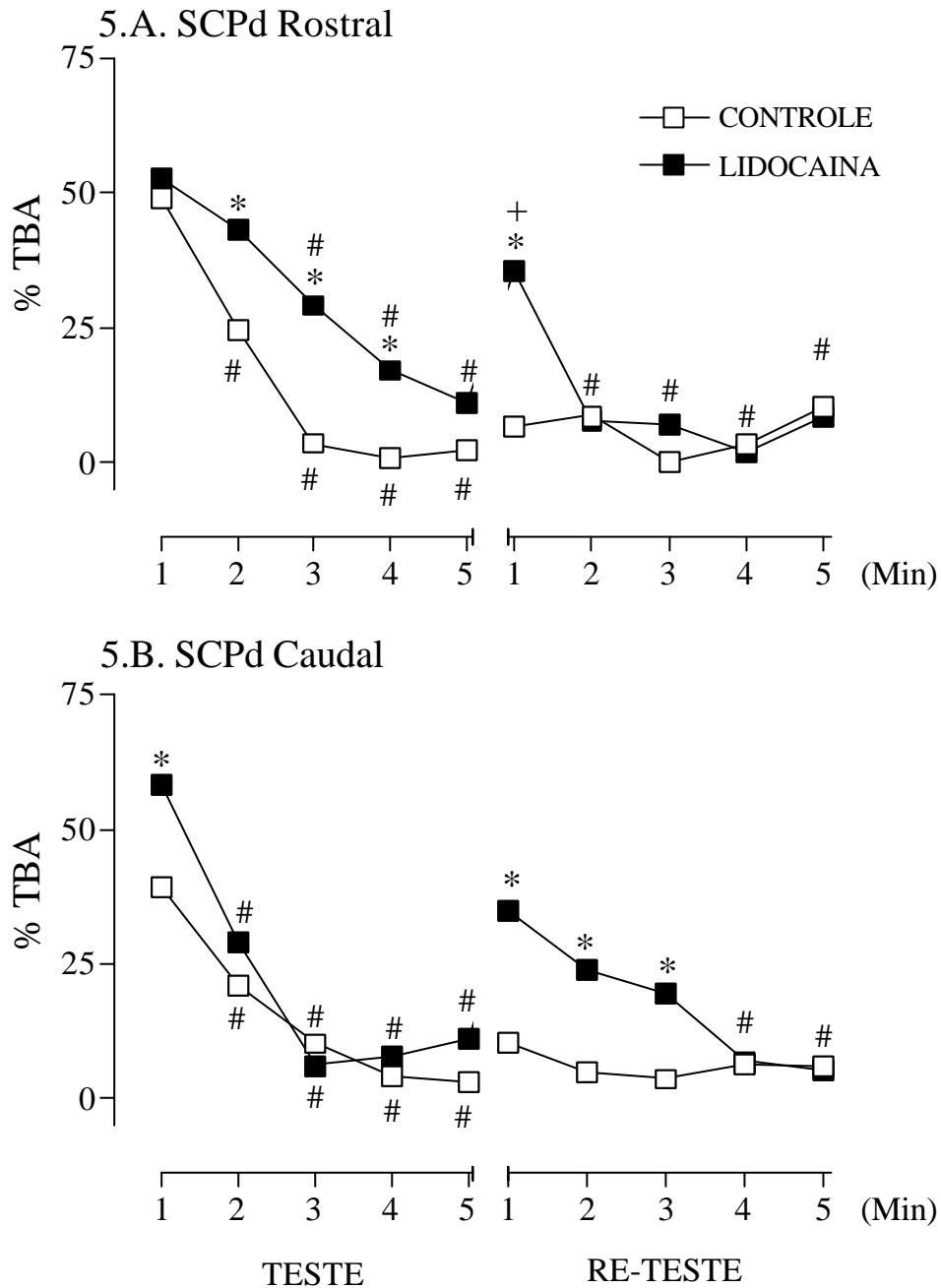


Fig.5. Análise minuto-a-minuto da %TBA após a inativação de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de lidocaína (n=9, nas duas porções), 15 min antes do teste no LCE, comparada com o grupo controle (n=12, nas duas porções). O re-teste foi realizado 24 h após, sem droga. As curvas representam as médias da %TBA do LCE. * $p<0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p<0,05$, significativamente diferente do valor do primeiro minuto na sessão. + $p<0,05$, diferente significativamente do último minuto do teste.

Na tabela 1, podemos observar outros parâmetros observados em ratos microinjetados com líquor ou lidocaína na SCPd rostral, considerados índices de atividade geral (Rodgers e Cole, 1994), possivelmente relacionados com atividade locomotora (FBF), avaliação de risco (FT; Bertoglio e Carobrez, 2000), e tempo de tomada de decisão (TPC) entre esquiiva/aproximação (Lee e Rodgers, 1990).

Com relação a FBF, a ANOVA não detectou diferença significativa entre o grupo experimental e o controle (Tabela 1.A), mostrando que o tratamento com lidocaína na SCPd rostral não afetou a atividade locomotora dos animais.

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito significativo do teste/re-teste [$F(1,19)=28.22;p<0.05$]. O teste *post hoc* mostrou que tanto o grupo controle, quanto o grupo lidocaína, mostraram aumento ($p<0,05$) na FT quando comparado aos valores dos respectivos grupos no teste (Tabela 1.B).

A ANOVA detectou efeito significativo do tratamento [$F(1,19)=10,10;p<0,05$] no TPC. O teste *post hoc* mostrou que este parâmetro foi aumentado ($p<0,05$) no grupo lidocaína tanto no teste quanto no re-teste (Tabela 1.C).

TABELA 1. Efeitos da inativação temporária e reversível com lidocaína na SCPd rostral, na FBF, na FT, e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

SCPd rostral		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,6 ± 0,7	6,6 ± 0,7
Lidocaína	5,3 ± 0,8	5,9 ± 0,5
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,4 ± 0,5	4,6 ± 0,6 [#]
Lidocaína	2,1 ± 0,6	6,1 ± 1,0 [#]
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	10,6 ± 2,2	20,6 ± 5,7
Lidocaína	26,2 ± 7,6 [*]	31,6 ± 8,1 [*]
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor no teste.		

Na tabela 2, podemos observar os mesmos parâmetros na SCPd caudal.

A ANOVA não detectou efeito significativo na FBF (Tabela 2.A), mostrando também nesta porção, que a atividade locomotora dos animais não foi afetada.

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito do teste/re-teste [$F(1,19)=9.53; p < 0.05$]. O teste *post hoc* mostrou que grupo lidocaína apresentou aumento significativo ($p < 0.05$) neste parâmetro, no re-teste, quando comparado com seu próprio valor no teste (Tabela 2.B).

Com relação ao TPC, ANOVA detectou um efeito marginal do tratamento [$F(1,19)=3,6; p=0,07$]. O teste *post hoc* mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) para o grupo lidocaína quando comparado com o controle, no re-teste (Tabela 2.C).

TABELA 2. Efeitos da inativação temporária e reversível com lidocaína na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

SCPd caudal		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A.	FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS	
Controle	3,7 ± 0,5	5,2 ± 0,9
Lidocaína	4,2 ± 0,7	6,4 ± 0,7
B.	FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS	
Controle	3,0 ± 0,7	3,6 ± 0,8
Lidocaína	1,3 ± 0,4	4,4 ± 0,6 [#]
C.	TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL	
Controle	13,4 ± 4,1	15,2 ± 5,1
Lidocaína	18,0 ± 4,4	32,2 ± 7,8 [*]

OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor no teste.

4.A.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os grupos controles da SCPd rostral e caudal estão de acordo com os relatos da literatura que mostram que a experiência prévia no LCE aumenta o medo (caracterizado pela resposta de esquiva) evocado numa segunda sessão neste modelo (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000). Isto porque, o grupo controle apresenta uma diminuição significativa na atividade nos braços abertos na segunda exposição. Observando o perfil comportamental minuto-a-minuto do grupo controle no teste, podemos visualizar que a diminuição na atividade nos braços abertos do LCE é gradual e ocorre ao longo dos minutos da exposição-teste, indicando uma aquisição de resposta de esquiva aos braços abertos. A retenção desta resposta de esquiva pode ser observada no re-teste, onde o animal expressa um perfil ansiogênico, com um valor de %FBA e %TBA

inferiores aos obtidos no teste.

Os resultados obtidos com os grupos que receberam lidocaína mostram que a inativação temporária e reversível com lidocaína de áreas rostrais e caudais da SCPd afeta o comportamento de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE de maneira muito similar.

No que diz respeito aos índices tradicionais de ansiedade, a inativação com lidocaína não afetou o perfil comportamental dos animais no teste. Nos dois grupos, houve aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos. No entanto, na avaliação minuto-a-minuto pôde-se evidenciar uma diminuição na aversão aos braços abertos ou uma tendência a efeito ansiolítico que não se observou no dado da sessão total, mostrando que este tipo de análise pode contribuir para uma avaliação comportamental mais completa.

No re-teste, o grupo que recebeu lidocaína no dia anterior antes do teste, mostrou um perfil comportamental diferente do grupo controle. Mais especificamente, o grupo lidocaína apresentou um aumento na atividade nos braços abertos em relação ao grupo controle, principalmente no 1º minuto da exposição re-teste. Podemos dizer que, os grupos nos quais a SCPd foi inativada durante o teste, não apresentaram o perfil ansiogênico exibido pelo grupo controle. Este resultado pode ser indicativo de que a SCPd é importante na percepção do labirinto como sendo um estímulo aversivo, ou ainda, nos processos de aprendizado da resposta de esquiva aos braços abertos. É importante destacar que,

este perfil menos ansioso foi visualizado nas duas porções estudadas, porém de maneira mais acentuada na SCPd caudal.

A atividade locomotora não foi afetada pela inativação da SCPd. Quanto a FT, o grupo lidocaína apresentou aumento neste parâmetro no re-teste quando comparado ao valores prévios no teste, tanto na SCPd rostral quanto caudal, indicando aumento no comportamento de avaliação de risco. Quanto ao TPC, o grupo lidocaína apresentou aumento neste parâmetro no re-teste quando comparado ao grupo controle, nas duas áreas estudadas, o que pode indicar aumento no tempo de tomada de decisão.

Os resultados obtidos no teste não nos permitem descartar a participação da SCPd nas respostas comportamentais observadas na exposição-teste no LCE. Apesar de que, durante a inativação da SCPd por lidocaína, os parâmetros tradicionais de ansiedade (sessão total) não foram alterados, a análise minuto-a-minuto evidenciou uma diminuição na aversão aos braços abertos, talvez conseqüente de uma diminuição da percepção do labirinto como sendo um estímulo aversivo. É importante destacar que, apesar de termos usado uma dose eficaz de lidocaína (File *et al.*, 1998), a aplicação foi unilateral. Em adição, na literatura, há experimentos com lesão mostrando que somente a inativação bilateral da SCP desencadeia efeito ansiolítico no LCE (Adamec, 2001).

Quanto ao re-teste, as respostas comportamentais nos levam a sugerir que a SCPd pode afetar o aprendizado da

resposta de esquiva que ocorre durante o teste no LCE, isto porque a inativação da SCPd pré-teste afeta a retenção desta resposta de esquiva e a expressão de um comportamento tipo-medo mais acentuado, observadas no grupo controle no re-teste neste modelo.

Estes resultados são duplamente importantes. Primeiro, reforça os dados da literatura que indicam que o LCE pode ser um modelo útil não somente para estudar respostas defensivas espontâneas no teste (Rodgers e Cole, 1994), como também pode ser utilizado no estudo de respostas aprendidas de medo no re-teste (File *et al.*, 1996). Segundo, mostra que a SCPd pode participar na aquisição e expressão destas respostas aprendidas de medo observadas no LCE. Esta participação da SCP em processos mais cognitivos pode ser indireta, mas é possível devido à suas conexões recíprocas com áreas prosencefálicas, como a amígdala e área medial pré-óptica (Rizvi *et al.*, 1991; 1992). Além disso, é bem aceito que o comportamento defensivo evocado pela estimulação desta estrutura pode ser mediado por ativação de receptores glutamatérgicos (para revisão ver Carobrez *et al.*, 2001). Dentre esses receptores, a ativação do receptor NMDA/GLY_B tem sido considerada essencial para muitos tipos de plasticidade sináptica, incluindo aquelas relacionadas a formação de memória, regulação do movimento (Wisden *et al.*, 2000). Recentemente, tais fenômenos relacionados à plasticidade neural, como potenciação de longo termo (LTP; Adamec, 2001) foram demonstrados na SCP.

4.B. ETAPA II. Efeitos da estimulação química com GLU ou com a associação GLY + GLU, em áreas rostrais e caudais da SCPd, sobre os comportamentos observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

Após o primeiro relato de "raiva" defensiva, midríase, retração de orelhas, vocalização e silvo em gatos provocados pela microinjeção de GLU na SCPd (Bandler, 1982), muitos estudos se seguiram e estas reações de defesa espécie-específicas, juntamente com o componente cardiovascular destas, foram sendo confirmadas e estudadas em diferentes animais (Krieger e Graeff, 1985; McDougall *et al.*, 1985; Bandler e Depaulis, 1991).

Estudos subseqüentes mostraram que determinados comportamentos defensivos pareciam ser mediados por neurônios localizados preferencialmente na metade caudal da SCP (Bandler *et al.*, 1985) ou ainda que o comportamento defensivo obtido através de estimulação química ao longo do eixo rostrocaudal da SCP poderia apresentar características distintas, que variam desde recuo defensivo (melhor visualizado na porção mais rostral), até esquiva ofensiva (melhor visualizada na porção mais caudal) (Bandler e Depaulis, 1991).

O GLU atua em diversos receptores específicos, metabotrópicos e ionotrópicos (Collingridge e Lester, 1989). Dentre estes receptores, é interessante salientar que, apesar do receptor NMDA ser principalmente um receptor glutamatérgico, isto é, ser ativado sob certas condições

pela liberação de GLU dos terminais nervosos, a responsividade do mecanismo receptor e a manutenção deste, parece depender dos níveis extracelulares de GLY (Leeson e Iversen, 1994). Uma outra consideração importante é que a neurotransmissão excitatória realizada pelo GLU pode ser auto-regulada através da ativação receptores metabotrópicos localizados no terminal pré-sináptico (Chen *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2002).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que a microinjeção de GLY ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd pode apresentar efeitos comportamentais diferenciados (Teixeira e Carobrez, 1999). O comportamento observado foi a resposta aversiva em ratos submetidos ao teste no LCE. Como visto anteriormente, no LCE a avaliação do comportamento é baseada no conflito "aproximação-esquiva" entre a motivação exploratória e a aversão natural a espaços abertos (Rodgers e Cole, 1994) e assim, a proporção de atividade nos braços abertos do labirinto pode ser utilizada como 'índice de ansiedade' (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985). A GLY nas doses mais baixas, usadas no estudo (80 e 120 nmol) causou uma redução significativa na atividade nos braços abertos, quando microinjetada na porção caudal da SCPd, sugerindo um efeito ansiogênico restrito à esta porção (Teixeira, 1997). Em contrapartida, os animais que receberam GLY na dose maior (240 nmol) apresentaram aumento na %TBA (mas não na %FBA) e comportamento explosivo 20 minutos após o teste no LCE, um sinal evidente de

neurotoxicidade, que pode ser indicativo não de um efeito ansiolítico, mas sim de um efeito estimulante da GLY quando aplicado na SCPd. Como o efeito ansiogênico da GLY foi abolido pela microinjeção de HA966 (Teixeira e Carobrez, 1999), composto com ações antagônicas no sítio GLY_B (Matheus *et al.*, 1994), nossos resultados apontaram para um papel diferenciado da ativação do receptor NMDA/GLY_B na SCPd.

4.B.1. OBJETIVO EXPERIMENTAL

A realização desta etapa experimental teve por finalidade a avaliação dos efeitos comportamentais da estimulação química com GLU ou com a associação GLY-GLU em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

4.B.2. PROCEDIMENTO

Os animais foram operados para implante de cânulas em áreas rostrais e caudais da SCPd seguindo os procedimentos gerais descritos anteriormente.

Nesta etapa (II) foram subdivididos em 2 conjuntos experimentais: 1. a) líquido (controle); b) GLU 20 nmol (GLU 20); c) GLU 40 nmol (GLU 40); e 2. a) controle; b) GLY 120 nmol + GLU 20 nmol, 1 minuto após (GLY-GLU 20); c) GLY 120 nmol + GLU 40 nmol, 1 minuto após (GLY-GLU 40).

No dia do teste no LCE, cada animal recebeu uma microinjeção de líquido ou dos diferentes compostos e procedeu-se como descrito no item 3.6 dos procedimentos gerais.

4.B.3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 6 a 9 e tabelas 3 a 6.

Na Fig.6 estão representados os dados obtidos após estimulação química com GLU em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.6.A), a ANOVA detectou um efeito na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) referente ao teste/re-teste [$F(1,30)=40,53;p<0,05$ e $F(1,30)=16,42;p<0,05$; respectivamente]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com o GLU na porção rostral não afetou a %FEA e %TBA durante o teste no LCE. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que confirma resultados já descritos na etapa I. Houve também uma diminuição significativa ($p<0,05$) na %FEA para o grupo que recebeu GLU no dia anterior, tanto na dose de 20 nmol, como na de 40 nmol, quando comparado com seus valores prévios no teste, mostrando que no re-teste estes grupos apresentam uma resposta de esquia aos braços abertos maior do que no teste.

Na SCPd caudal (Fig.6.B), a ANOVA detectou um efeito na %FEA referente ao teste/re-teste [$F(1,28)=9,26;p<0,05$] e uma tendência referente ao tratamento [$F(2,28)=2,73;p=0,08$]. Na %TBA, a ANOVA detectou um efeito referente ao tratamento [$F(2,28)=5,42;p<0,5$] e ao teste/re-teste [$F(1,28)=4,87;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com GLU na porção caudal afetou a %FEA e %TBA durante o teste no LCE, pois o

grupo que recebeu a microinjeção de GLU na doses 20 nmol mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, sugerindo um efeito ansiogênico. Na dose maior, o GLU 40 nmol, não afetou a atividade nos braços abertos. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que parece indicar que experiência prévia no labirinto aumenta o medo evocado numa segunda sessão. O teste *post hoc* mostrou que no re-teste, a %FEA do grupo GLU 40 foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que seu valor no teste. É importante destacar que, no grupo GLU 40, foram descartados 2 animais (cerca de 20% do grupo), que ficaram durante toda a sessão-teste imóveis na plataforma central (reação de congelamento?).

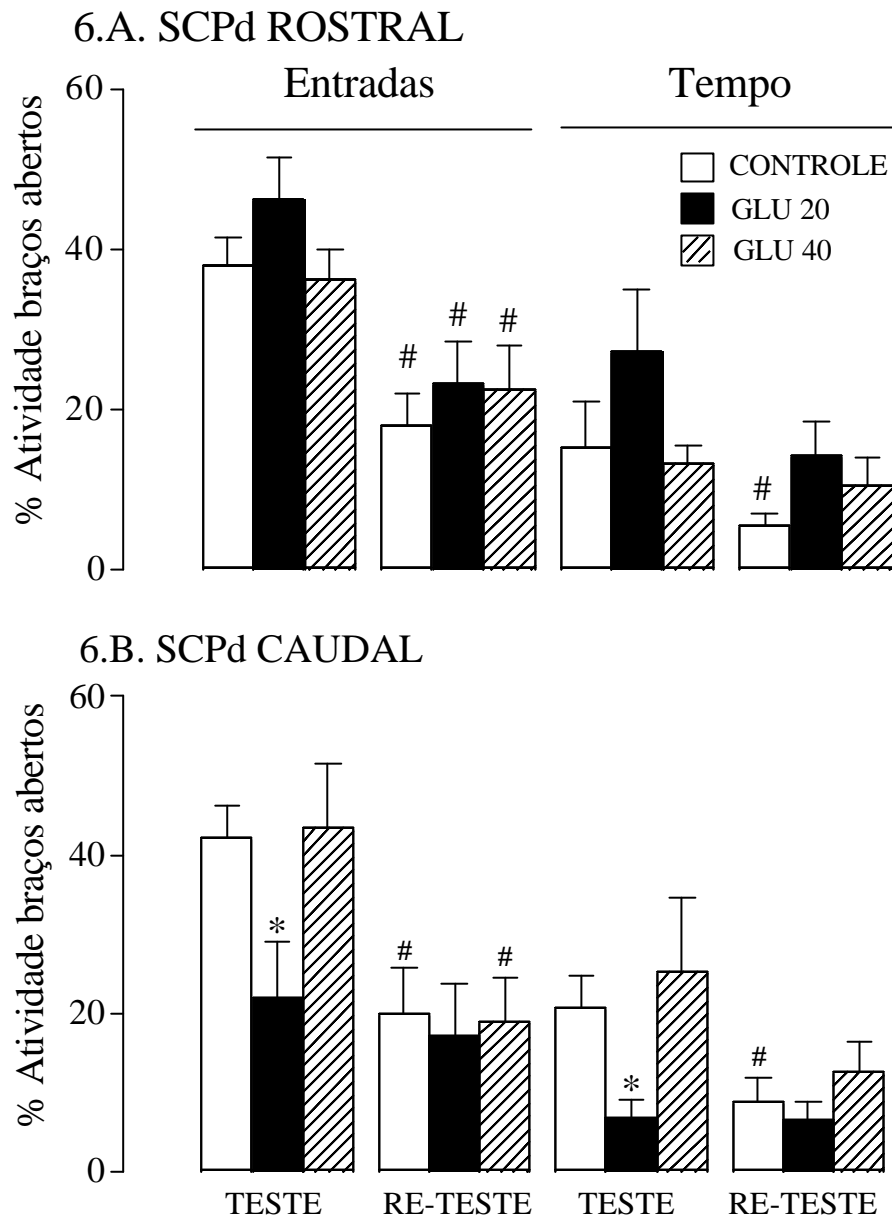


Fig.6. Efeitos na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) após estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de GLU 20 nmol (n=9 e 11, respectivamente) e 40 nmol (n=10 e 9, respectivamente), 15 min antes do teste no LCE, comparados com o grupo controle (n=14 e 11, respectivamente). O re-teste foi realizado 24 h após, sem droga. Os dados estão representados como médias \pm epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor do respectivo grupo no teste.

A Fig.7 mostra a %TBA minuto-a-minuto, nas sessões no LCE, para os grupos controle e estimulados com GLU.

Na porção rostral (Fig.7.A), a ANOVA detectou efeito da exposição minuto-a-minuto [$F(1,30)=38,27;p<0,05$] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que para o grupo controle, há diminuição ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º minuto do teste e o 1º minuto do re-teste, sugerindo que há uma aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos e confirmando dados da literatura (Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000). Para os grupos experimentais também podemos observar uma diminuição ($p<0,05$) na %TBA quando comparamos o 1º minuto do teste e do re-teste. No re-teste, o teste *post hoc* também mostrou um aumento ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do grupo GLU 20 quando comparado com o grupo controle e no grupo 40 quando comparado com seu último minuto no teste.

Na porção caudal (Fig.7.B), a ANOVA detectou efeito do tratamento [$F(2,28)=4,49;p<0,05$] e da exposição minuto-a-minuto [$F(9,252)=8,10;p<0,05$] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que o grupo GLU 20 mostra uma diminuição ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do teste quando comparado com o controle, indicando que o efeito ansiogênico evidenciado na sessão total, pode ser observado principalmente no 1º minuto de exposição. Há também diminuição ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º minuto do teste e o 1º minuto do re-teste para os grupos controle e GLU 40. No re-teste, há um aumento ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do grupo GLU 20 quando comparado com o seu último minuto no teste.

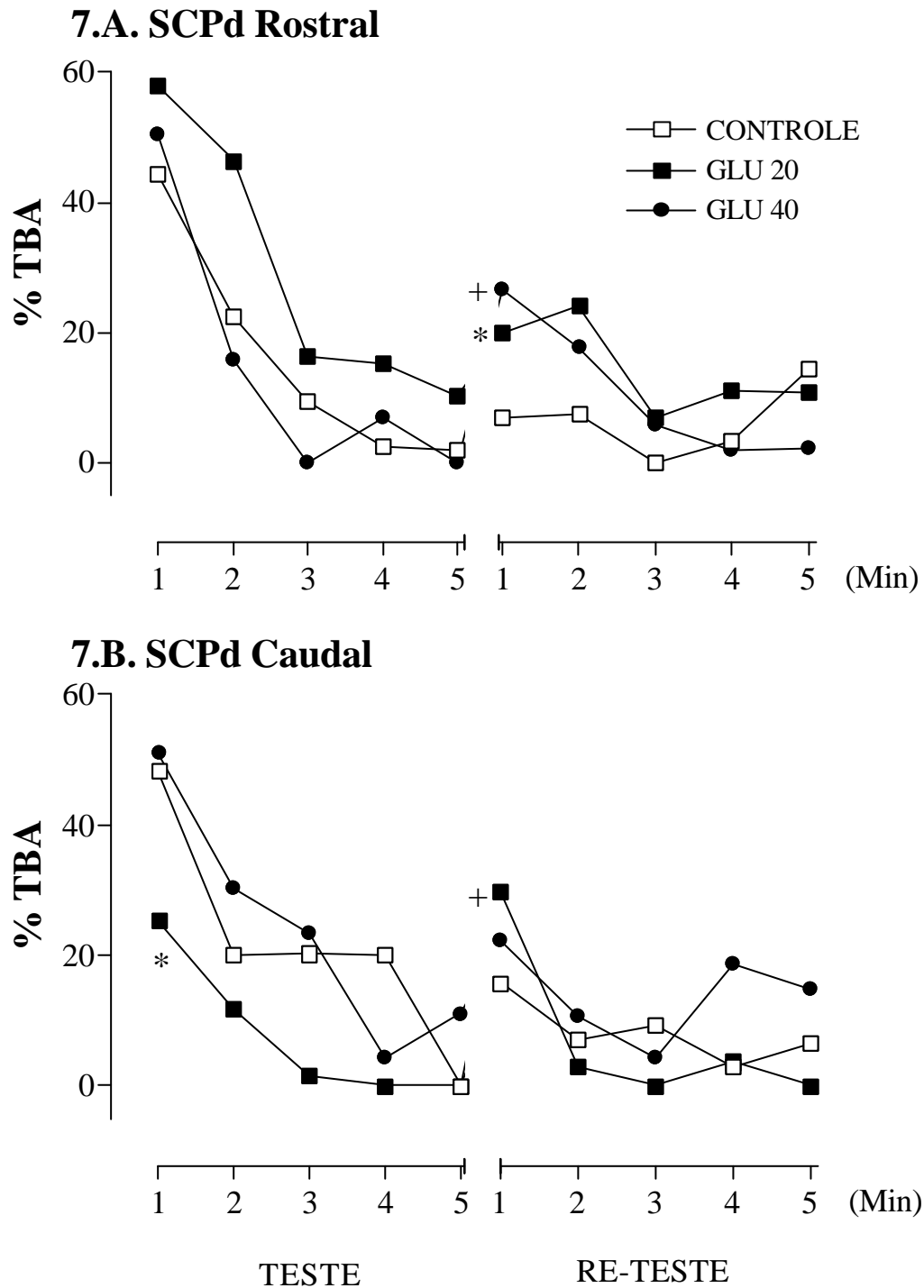


Fig. 7. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de GLU 20 nmol (n=9 e 11, respectivamente) e 40 nmol (n=10 e 9, respectivamente), 15 min antes do teste no LCE, comparada com o grupo controle (n=14 e 11, respectivamente). O re-teste foi realizado 24 h após, sem drogas. As curvas representam as médias da %TBA do LCE. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. + $p < 0,05$, diferente significativamente do último minuto do teste.

Na tabela 3, podemos observar outros parâmetros observados na SCPd rostral, possivelmente relacionados a atividade geral (Rodgers e Cole, 1994).

Com relação a FBF, a ANOVA detectou um efeito referente ao teste/re-teste [$F(1,30)=10,45;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação química com o GLU não afetou a FBF, mas este parâmetro mostrou-se aumentado ($p<0,05$) no re-teste para o grupo GLU 20 nmol, quando comparado com seu respectivo valor no teste (Tabela 3.A).

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito do teste/re-teste [$F(1,30)=8.46;p<0.05$]. O teste *post hoc* mostrou aumento ($p<0.05$) na FT, para o grupo controle no re-teste, quando comparado ao seu respectivo valor no teste (Tabela 3.B).

A ANOVA não detectou efeito no TPC (tabela 3.C).

SCPd rostral		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,5 ± 0,6	5,9 ± 0,7
GLU 20 nmol	3,9 ± 0,6	6,3 ± 1,1 [#]
GLU 40 nmol	4,2 ± 0,8	6,1 ± 0,6
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,4 ± 0,5	4,2 ± 0,5 [#]
GLU 20 nmol	3,2 ± 0,7	5,0 ± 1,0
GLU 40 nmol	1,9 ± 0,4	3,5 ± 1,0
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	11,3 ± 2,8	17,0 ± 5,1
GLU 20 nmol	28,1 ± 7,1	24,11 ± 9,28
GLU 40 nmol	29,7 ± 10,5	17,9 ± 3,9
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. [#] $p<0,05$, significativamente diferente do valor no teste.		

A tabela 4 mostra esses parâmetros na SCPd caudal.

A ANOVA detectou efeito na FBF referente ao teste/re-teste [$F(1,28)=4,88;p<0,05$]. O *post hoc* mostrou que a estimulação química com o GLU não afetou a FBF no teste, mas no re-teste, o grupo GLU 20 mostrou aumento ($p<0,05$) quando comparado com seu respectivo controle (Tabela 4.A).

Quanto a FT, a ANOVA não detectou efeito (Tabela 4.B).

A ANOVA detectou um efeito do tratamento [$F(2,28)=5,32;p<0,5$] e do teste/re-teste [$F(1,28)=8,48;p<0,05$], no TPC. O *post hoc* mostrou aumento ($p<0,05$) neste parâmetro, para o grupo GLU 40 na SCPd caudal durante o teste e diminuição ($p<0,05$) no re-teste quando comparado ao valor prévio (Tabela 2.C). Este é um resultado relevante, também porque neste grupo foram descartados 2 animais que permaneceram os 5 minutos de exposição do teste na plataforma central.

TABELA 4. Efeitos da estimulação química com microinjeção de GLU 20 nmol e 40 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.		
SCPd caudal		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,6 ± 0,9	6,0 ± 0,9
GLU 20 nmol	2,9 ± 0,6	3,5 ± 0,9 [#]
GLU 40 nmol	4,1 ± 0,9	5,8 ± 0,7
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	3,7 ± 0,6	4,9 ± 1,0
GLU 20 nmol	2,4 ± 0,6	3,7 ± 0,8
GLU 40 nmol	4,6 ± 0,7	4,8 ± 1,0
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	21,0 ± 8,5	16,4 ± 5,0
GLU 20 nmol	15,2 ± 4,1	8,4 ± 4,1
GLU 40 nmol	64,3 ± 15,5 [*]	29,5 ± 9,4 [#]
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p<0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p<0,05$, significativamente diferente do valor no teste.		

Na Fig.8 estão representados os dados obtidos após

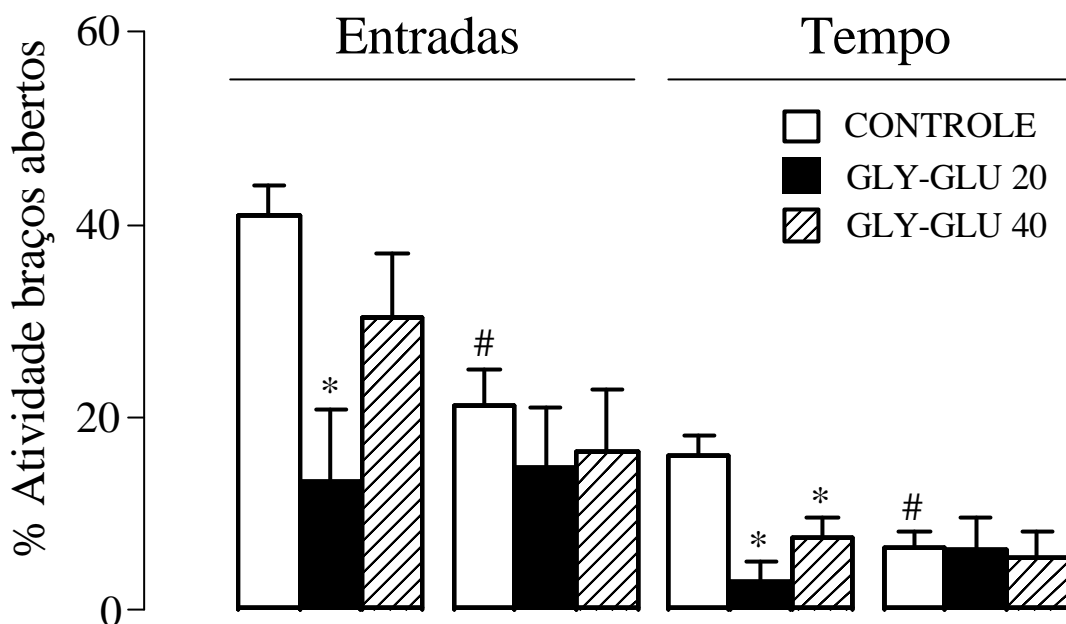
estimulação química com a associação GLY+GLU em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.8.A), a ANOVA detectou um efeito na %FEA referente ao tratamento [$F(2,24)=5,52;p<0,05$] e ao teste/re-teste [$F(1,24)=5,68;p<0,05$] e na %TBA um efeito referente ao tratamento [$F(2,24)=5,74;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com o GLY-GLU na porção rostral afetou a atividade nos braços abertos durante o teste no LCE. No teste, a %FEA foi diminuída ($p<0,05$) após estimulação com GLY-GLY 20 nmol, enquanto que %TBA foi diminuída ($p<0,05$) pela associação GLY-GLU nas duas doses utilizadas, sugerindo que a combinação GLY-GLU pode aumentar a resposta de esquiva na SCPd rostral. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que confirma resultados já descritos anteriormente.

Na SCPd caudal (FIG.8.B), a ANOVA detectou um efeito nas %FEA e %TBA referente ao teste/re-teste [$F(1,29)=30,59;p<0,05$ e $F(2,29)=22,05;p<0,05$, respectivamente]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com GLY-GLU na porção caudal não afetou a atividade nos braços abertos durante o teste no LCE. Este dado é bastante surpreendente porque a GLY 120 nmol, assim como o GLU 20 nmol, sozinhos são capazes de provocar efeito ansiogênico (Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez et al., 2001). No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nas

%FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que corrobora nossos resultados anteriores. O teste *post hoc* mostrou que no re-teste, esses parâmetros foram também diminuídos ($p < 0,05$) nos grupos experimentais (GLY-GLU).

8.A. SCPd ROSTRAL



8.B. SCPd CAUDAL

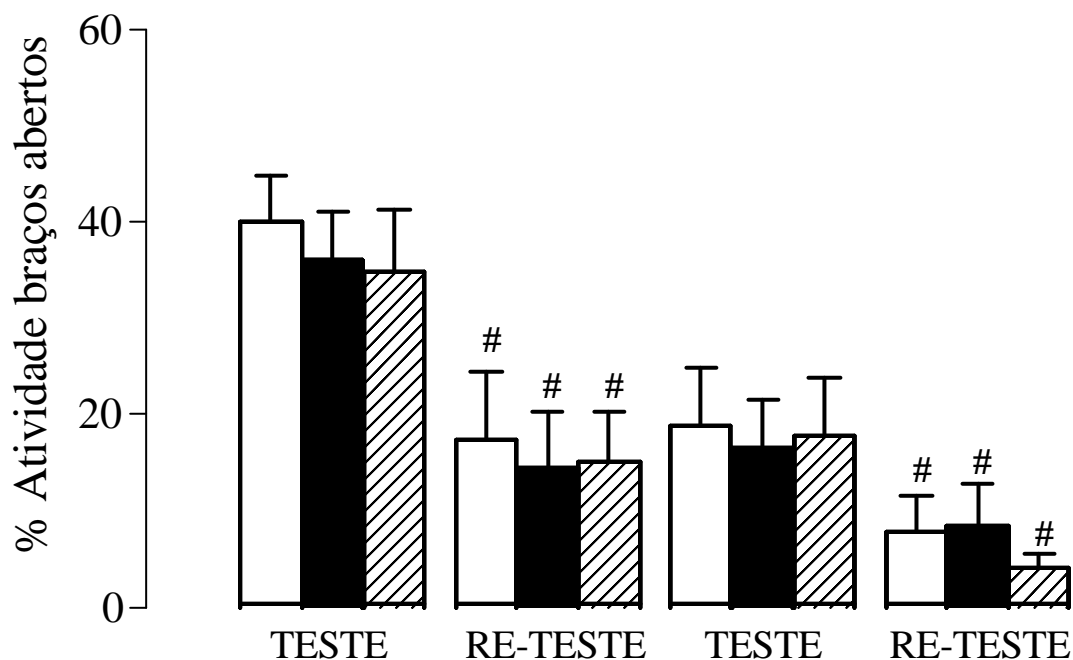


Fig.8. Efeitos na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) após estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de GLY-GLU 20 nmol (n=08 e 07, respectivamente) e GLY-GLU 40 nmol (n=11 nos dois grupos), 15 min antes do teste no LCE, comparados com o grupo controle (n=12 e 10, respectivamente). O re-teste foi realizado 24 h após, sem drogas. Os dados estão representados como médias \pm epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor do respectivo grupo no teste.

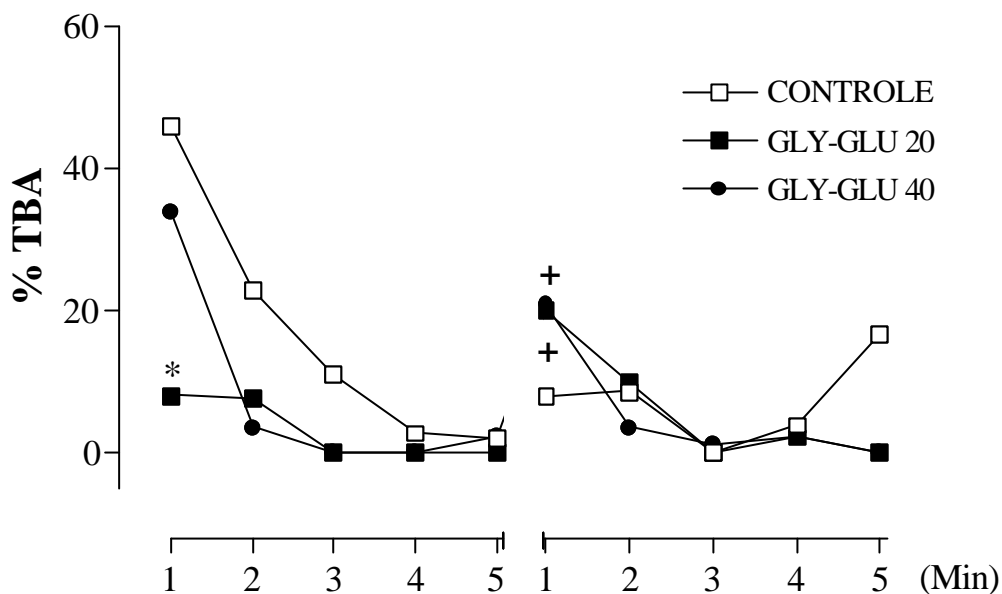
Na Fig.9 podemos observar a %TBA ao longo dos 5 minutos de exposição no teste e no re-teste no LCE, do grupo controle e dos grupos estimulados com a associação GLY-GLU.

Na porção rostral (Fig.9.A), a ANOVA detectou efeito do tratamento [$F(2,24)=6,32;p=0,05$] e da exposição minuto-a-minuto [$F(9,216)=6,91;p=0,05$] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que o grupo que foi estimulado com a combinação GLY-GLU 20 nmol antes do teste mostrou diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do teste no LCE. Este resultado, como visto também para o GLU 20 na SCPd caudal, pode indicar que o efeito ansiogênico observado na sessão total, aparece principalmente no 1º minuto de exposição. Para o grupo controle, há diminuição ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º minuto do teste e o 1º minuto do re-teste, como visto anteriormente. Os grupos que receberam estimulação com GLY-GLU no dia anterior apresentaram aumento ($p<0,05$) no 1º minuto do re-teste e relação ao último minuto do teste.

Na SCPd caudal (Fig.9.B), a ANOVA detectou efeito da exposição minuto-a-minuto [$F(9,261)=15,24;p<0,05$], na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que ocorreu uma diminuição ($p<0,05$) na %TBA quando comparamos o 1º minuto do teste e do re-teste nos grupos controle e experimentais. O teste *post hoc* também mostrou aumento ($p<0,05$) na %TBA no 1º minuto do teste para o grupo GLY-GLU 20, quando comparado com o controle.

De maneira geral, houve retenção da resposta de esquiva aos braços abertos, nas duas porções estudadas, tanto para o grupo controle, quanto os experimentais.

9.A. SCPd Rostral



9.B. SCPd Caudal

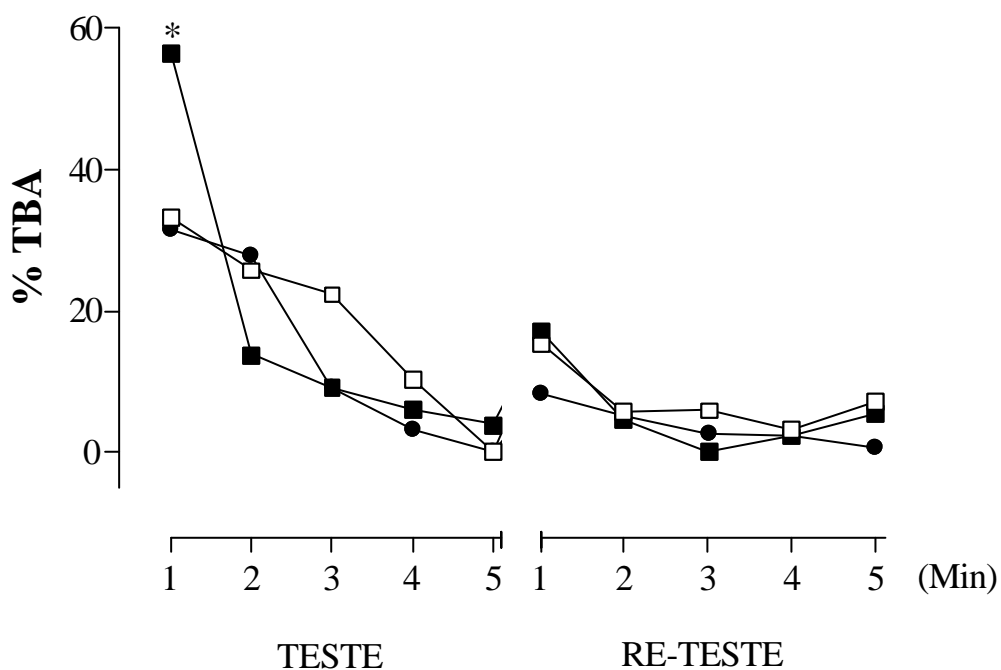


Fig.9. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de GLY-GLU 20 nmol (n=08 e 07, respectivamente) e GLY-GLU 40 nmol (n=11 nos dois grupos), 15 min antes do teste no LCE, comparada com o grupo controle (n=12 e 10, respectivamente). O re-teste foi realizado 24 h após, sem drogas. As curvas representam as médias da %TBA do LCE. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. + $p < 0,05$, diferente significativamente do último minuto do teste.

Na tabela 5, podemos observar outros parâmetros observados na SCPd rostral, possivelmente relacionado a atividade geral (Rodgers e Cole, 1994).

Com relação a FBF, a ANOVA detectou um efeito referente ao teste/re-teste [$F(1,24)=7,28;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação química com o GLY-GLU não afetou a FBF durante o teste no LCE, mas este parâmetro mostrou-se aumentado no re-teste para o grupo controle ($p=0,05$) e para o grupo que foi estimulado no dia anterior com GLY-GLU 20 nmol ($p<0,05$), quando comparados com seus respectivos valores no teste (Tabela 5.A).

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito significativo referente ao tratamento [$F(2,24)=4.74;p<0.05$] e ao teste/re-teste [$F(1,24)=32.90;p<0.05$]. O teste *post hoc* mostrou aumento significativo ($p<0.05$) para a FT do grupo controle no re-teste, quando comparado ao seu respectivo valor no teste. O grupo que foi estimulado no dia anterior com GLY-GLU 20 nmol também mostrou este parâmetro aumentado ($p<0.05$) quando comparado ao seu respectivo valor no teste e quando comparado com o controle no re-teste (Tabela 5.B).

A ANOVA não detectou efeito significativo no TPC (tabela 5.C).

TABELA 5. Efeitos da estimulação química com microinjeção de GLY-GLU 20 nmol e GLY-GLU 40 nmol na SCPd rostral, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

SCPd rostral		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,3 ± 0,6	6,1 ± 0,7
GLY-GLU 20	3,0 ± 0,6	5,6 ± 0,7 [#]
GLY-GLU 40	3,6 ± 1,0	4,1 ± 0,7
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,2 ± 0,5	4,5 ± 0,5 [#]
GLY-GLU 20	2,9 ± 0,8	7,7 ± 0,5 ^{#*}
GLY-GLU 40	2,6 ± 1,0	3,7 ± 0,6
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	12,1 ± 3,1	19,3 ± 5,8
GLY-GLU 20	12,1 ± 4,1	8,5 ± 3,5
GLY-GLU 40	13,0 ± 6,9	4,14 ± 2,3

OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor no teste.

Na tabela 6, podemos observar que a ANOVA não detectou efeito significativo nestes parâmetros na SCPd caudal.

TABELA 6. Efeitos da estimulação química com microinjeção de GLY-GLU 20 nmol e 40 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

SCPd caudal		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,5 ± 0,9	5,9 ± 0,8
GLY-GLU 20	3,9 ± 0,5	3,6 ± 0,7
GLY-GLU 40	3,7 ± 0,6	5,3 ± 1,1
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,8 ± 0,6	3,8 ± 0,7
GLY-GLU 20	3,2 ± 0,8	3,5 ± 0,8
GLY-GLU 40	2,7 ± 0,6	3,3 ± 0,7
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	12,9 ± 3,4	11,7 ± 5,0
GLY-GLU 20	39,4 ± 15,9	33,4 ± 19,4
GLY-GLU 40	40,5 ± 21,4	12,1 ± 5,6

OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm.

4.B.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta etapa do nosso trabalho mostram que a estimulação química de áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos com a microinjeção de GLU ou da combinação GLY-GLU afetam o comportamento de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

A estimulação com GLU produziu uma diminuição significativa na atividade nos braços abertos durante o teste no LCE, sugerindo efeito ansiogênico na dose de 20 nmol, quando aplicada na porção caudal da SCPd, enquanto na dose de 40 nmol não apresentou efeito significativo. O único parâmetro afetado pelo GLU 40 nmol foi o TPC, que apresentou aumento significativo durante o teste no LCE, o que pode indicar aumento no tempo de tomada de decisão, segundo alguns autores (Lee e Rodgers, 1990).

No re-teste, os animais que foram estimulados no dia anterior com o GLU apresentaram retenção da resposta de esquiva na SCPd rostral e caudal e, diminuição na atividade exploratória (diminuição da FBF) restrito à SCPd caudal.

Os resultados com a estimulação com o GLU sugerem efeito ansiogênico do GLU no teste no LCE, dependente da dose e da área estimulada (SCPd caudal), reproduzindo o perfil comportamental observado com a GLY microinjetada na dose 120 nmol em estudos realizados anteriormente nesse laboratório (Teixeira e Carobrez, 1999). Esse efeito diferencial do GLU, assim como o da GLY, pode ser devido ao fato de que as ações destes compostos dependerem também das

concentrações dos moduladores endógenos que se ligam ao complexo receptor NMDA/GLY_B (Johnson e Ascher, 1987; Kemp e Leeson, 1993; Danysz e Parsons, 1998). Há relatos na literatura mostrando que a ativação do NMDA/GLY_B pode ser modulada por diferenças na afinidade dos agonistas ou ainda na concentração destes (Priestley *et al.*, 1995; Zafra *et al.*, 1995; Buller e Monaghan, 1997; Supplisson e Bergman, 1997; Berger *et al.*, 1998; Bergeron *et al.*, 1998; Danysz e Parsons, 1998; Danbolt, 2001). No entanto, é importante lembrar que o GLU age não somente no NMDA, mas também em outros tipos de receptores para AAE (Collingridge e Lester, 1989), presentes na SCPd (Albin *et al.*, 1990).

O resultado da estimulação da SCPd caudal, mostrando que a dose menor de GLU testada (20 nmol) é suficiente para evocar aumento na resposta de esquiva, enquanto na dose maior de 40 nmol, o GLU não apresenta efeito significativo neste parâmetro é intrigante. Para justificar este resultado, é importante lembrar que as respostas comportamentais detectadas no LCE envolvem basicamente comportamentos de conflito e esquiva (File *et al.*, 1998). Talvez na dose menor, a estimulação com GLU tenha desencadeado níveis moderados de medo e produzido comportamento de esquiva, enquanto que na dose maior tal estimulação pode ter evocado níveis elevados de medo e causado uma mudança no modo de resposta do animal para um comportamento defensivo que não pode ser detectado utilizando-se o LCE. Esta mudança no modo de resposta já foi

descrita em pelo menos dois outros estudos (Kalynchuk et al., 1997; Walker et al., 1997). Em estudos com abrasamento ("kindling") da amígdala foi demonstrado que os animais apresentam um nível extremo de emocionalidade, caracterizado por reações de congelamento ("freezing") no campo aberto, resistência à captura, entre outros parâmetros. No entanto, ao serem expostos ao LCE estes animais apresentaram aumento na atividade nos braços abertos (e não o contrário, que seria o esperado para um efeito ansiogênico) que foi interpretado como tentativa de fuga do LCE (Kalynchuk et al., 1997). Em estudos com sobressalto acústico potenciado pelo medo, um outro modelo possivelmente relacionado com ansiedade, foi demonstrado que o medo pode ser diretamente proporcional à intensidade do choque utilizado no condicionamento do sobressalto acústico. No entanto, a magnitude do sobressalto parece não estar 'monotonicamente' relacionada com o medo, isto porque níveis moderados de medo produzem sobressalto acústico máximo, enquanto que níveis elevados de medo produzem outras respostas que parecem não incluir sobressalto (para revisão ver Walker et al., 1997).

No que diz respeito aos resultados obtidos com a associação GLY-GLU, eles foram bastante importantes para o nosso estudo, pois mostraram que a SCPd rostral também pode participar da elaboração de comportamentos de esquiva e conflito detectados durante o teste no LCE, exigindo entretanto, estimulação mais intensa para desencadear tais comportamentos. A estimulação química com GLY-GLU 20 nmol

alterou os índices tradicionais de ansiedade durante o teste, sugerindo efeito ansiogênico na SCPd rostral. No reteste, a FBF e a FT apresentaram-se aumentadas para o grupo GLY-GLU 20, mostrando que não houve prejuízo na atividade geral.

Estudos eletrofisiológicos têm mostrado que o receptor NMDA é ativado alostericamente pela estimulação conjunta de GLU e GLY (Jonhson e Ascher, 1987; Kleckner e Dingledine, 1988; Lester *et al.*, 1993). A interação entre as subunidades do receptor NMDA/GLY_B ainda não está totalmente entendida (Nahum-Levy *et al.*, 2001). No entanto, a literatura sugere que para que este complexo-receptor seja funcional ele deve ter a combinação de pelo menos uma subunidade NR1 com uma NR2 (Danysz e Parson, 1998; Dingledine *et al.*, 1999). A GLY liga-se em um sítio localizado na subunidade NR1 (Hirai *et al.* 1996), enquanto que o sítio de ligação para o GLU localiza-se na subunidade NR2 (Laube *et al.*, 1997).

Nossos resultados com a estimulação química combinada de GLY e GLU mostram a possibilidade de interação entre agonista e co-agonista do complexo receptor NMDA/GLY_B modulando as respostas comportamentais evocadas pela ativação deste receptor. Na SCPd rostral, a GLY possivelmente favorece a ação do GLU no receptor NMDA, desencadeando aumento nas respostas de esquiva e conflito nos ratos submetidos ao teste no LCE. Na SCPd caudal, a estimulação da associação GLY-GLU não alterou as respostas comportamentais de esquiva e conflito observadas no LCE, contudo a alteração no

parâmetro relacionado a tomada de decisão, assim como a reação de imobilidade apresentada por alguns animais (20%) que foram descartados, sugerem uma mudança no padrão de resposta do animal.

4.C. ETAPA III. Efeitos da estimulação química com agonistas do receptor NMDA/GLY_B, em áreas rostrais e caudais da SCPd, sobre os comportamentos observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

O receptor NMDA/GLY_B é alostericamente ativado pela estimulação conjunta dos sítios de ligação do GLU e da GLY (Jonhson e Ascher, 1987, Kleckner e Dingledine, 1988; Lester *et al.*, 1993; Chatterton *et al.*, 2002). Os aminoácidos endógenos GLY ou DSER (Schell *et al.*, 1997; Mothet *et al.*, 2000) ligam-se a subunidade NR1 (Hirai *et al.* 1996), enquanto o GLU se liga a subunidade NR2 (Laube *et al.*, 1997). Além destes sítios de reconhecimento para os agonistas, o receptor NMDA/GLY_B possui diversos sítios regulatórios para o magnésio, para o zinco e para as poliaminas (Leeson e Iversen, 1994). O receptor NMDA/GLY_B pode também ser regulado por fosfatases e tirosinas quinases (Wang e Salter, 1994).

Dependendo da combinação entre as subunidades NR1 e NR2 (A-D), o receptor formado pode exibir diferenças na afinidade por seus ligantes (Dingledine *et al.*, 1999), na abertura do canal associado (Monyer *et al.*, 1992), e na capacidade de atuar como um "sistema detector de coincidência". Detecção de coincidência é o nome dado à ocorrência de eventos sincrônicos e relacionados, que permitem a neurotransmissão, potenciação sináptica e outros fenômenos possivelmente envolvidos na plasticidade neuronal (Tsien, 2000; Da-Rocha *et al.*, 2001).

A ativação dos receptores NMDA/GLY_B pode causar despolarização da membrana e influxo de cálcio no neurônio pós-

sináptico, iniciando mudanças celulares (Dingledine *et al.*, 1999). Tal ativação, pode também ativar a enzima óxido nítrico (NO) sintase (NOS) e conseqüentemente aumentar a produção de NO (Paakkari e Lindsberg, 1995), que parece ter um papel regulatório na excitabilidade neuronal (Lovick e Key, 1996). Recentemente, estudos imunocitoquímicos demonstraram que o receptor NMDA pode também estar presente no terminal pré-sináptico. No entanto, a importância funcional deste subtipo de receptor ainda não foi estabelecida (Paquet e Smith, 2000).

De maneira geral, o receptor NMDA parece estar envolvido em muitos processos funcionais, incluindo alguns tipos de plasticidade sináptica (Wisden *et al.*, 2000). Para estudar o papel da ativação deste receptor, agonistas do sítio da GLY_B acoplado ao NMDA têm sido utilizados como uma alternativa bastante importante (Monahan *et al.*, 1989; Flood *et al.*, 1992; Teixeira e Carobrez, 1999; Walker *et al.*, 2002), devido aos possíveis efeitos neurotóxicos dos agonistas seletivos para o sítio do GLU no receptor NMDA (Olney, 1994).

Como mencionado anteriormente, utilizando-se estudos autorradiográficos (Albin *et al.*, 1990) e de hibridização *in situ* (Tolle *et al.*, 1993) foi demonstrado na SCPd a presença de receptores NMDA/GLY_B, e nos últimos anos tem sido relatado que estes receptores possivelmente participam na mediação de reações de defesa (comportamentais e cardiovasculares) em ratos (Krieger e Graeff, 1985; Bandler, 1988; Batista-da-Silva *et al.*, 1990; Bandler e Depaulis,

1991; Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez et al., 2001; Schenberg et al., 2001).

Os dados da literatura, juntamente com os resultados descritos na etapa anterior (II) indicam um papel diferenciado da ativação do receptor NMDA/GLY_B na SCPd. Em uma etapa subsequente, nos propusemos a verificar se o perfil ansiogênico (dependente da dose e da área-alvo) observado anteriormente poderia ser obtido também com agonistas seletivos do complexo receptor NMDA/GLY_B. Para tanto, utilizamos o NMDA, a GLY e a DSER em diferentes doses microinjetados em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE. No teste, foram avaliados os efeitos imediatos da estimulação química com estes diferentes agonistas do receptor NMDA/GLY_B, nos comportamentos de conflito e esquiva visualizados no LCE. No re-teste, nosso objetivo foi tentar identificar conseqüências comportamentais da experiência prévia neste modelo, associado a microinjeção de compostos potencialmente ansiogênicos, ligantes do receptor NMDA/GLY_B.

4.C.1. OBJETIVO EXPERIMENTAL

A realização desta etapa experimental teve por finalidade a avaliação dos efeitos comportamentais da estimulação química com NMDA, GLY e DSER em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

4.C.2. PROCEDIMENTO

Os animais foram operados para implante de cânulas em áreas rostrais e caudais da SCPd seguindo os procedimentos gerais descritos anteriormente.

Nesta etapa (III) foram subdivididos em 3 conjuntos experimentais: 1. a) líquido (controle); b) NMDA 25 pmol (NMDA 25); c) NMDA 50 pmol (NMDA 50); d) NMDA 100 pmol (NMDA 100) e 2. a) controle; b) GLY 120 nmol (GLY 120); c) GLY 180 nmol (GLY 180) e 3. a) controle; b) DSER 160 nmol (DSER 160); c) DSER 320 nmol (DSER 320).

No dia do teste no LCE, cada animal recebeu uma microinjeção de líquido ou de um dos diferentes compostos e procedeu-se como descrito no item 3.6 dos procedimentos gerais.

4.C.3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta etapa experimental estão representados nas figuras 10 a 15 e tabelas 7 a 12.

Na Fig.10 refere-se aos ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE após a estimulação química com NMDA em áreas rostrais e caudais da SCPd.

Na SCPd rostral (Fig.10.A), a ANOVA detectou um efeito na atividade nos braços abertos, referente ao tratamento [%FBA: $F(3,40)=5,59; p<0,05$ e %TBA: $F(3,40)=5,49; p<0,05$]. A ANOVA também apontou interação entre o tratamento x teste/re-teste [%FBA: $F(3,40)=4,31; p<0,05$ e %TBA: $F(3,40)=3,04; p<0,05$]. O *post hoc* mostrou que a estimulação com o NMDA na porção rostral afetou a %FEA e %TBA durante o teste no LCE, sendo que o grupo

estimulado com NMDA na doses 50 ou 100 pmol mostrou uma diminuição ($p<0,05$) em relação ao grupo controle, sugerindo efeito ansiogênico. No re-teste, houve uma diminuição ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seus respectivos valores no teste, o que confirma resultados já descritos na etapa I e II. Houve também uma diminuição ($p<0,05$) na atividade nos braços abertos para o grupo que recebeu NMDA no dia anterior, na dose de 50 pmol, quando comparado com seu valor no teste, assim como quando comparado com o controle do re-teste. Assim, este grupo no re-teste, mostra uma resposta de esquia aos braços abertos ainda mais acentuada do que no teste. Em contrapartida, o grupo NMDA 25 mostrou no re-teste um perfil comportamental semelhante ao observado no teste e, diferente do grupo controle no re-teste.

Na SCPd caudal (Fig.10.B), a ANOVA detectou efeito referente ao teste/re-teste [%FEA: $F(1,43)=7,81;p<0,05$ e %TBA: $F(1,43)=6,81;p<0,5$]. O *post hoc* mostrou que o NMDA na SCPd caudal afetou a atividade nos braços abertos durante o teste no LCE, pois o grupo estimulado com o NMDA na dose 25 pmol, mostrou uma diminuição ($p<0,05$) em relação ao grupo controle, sugerindo um efeito ansiogênico. Nas doses maiores, o NMDA não afetou a atividade nos braços abertos. No re-teste, houve uma diminuição ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado ao seu valor no teste, como já descrito anteriormente. O *post hoc* mostrou que, no re-teste, a %FEA do grupo NMDA 50 mostrou-se aumentada ($p<0,05$), em relação ao seu controle.

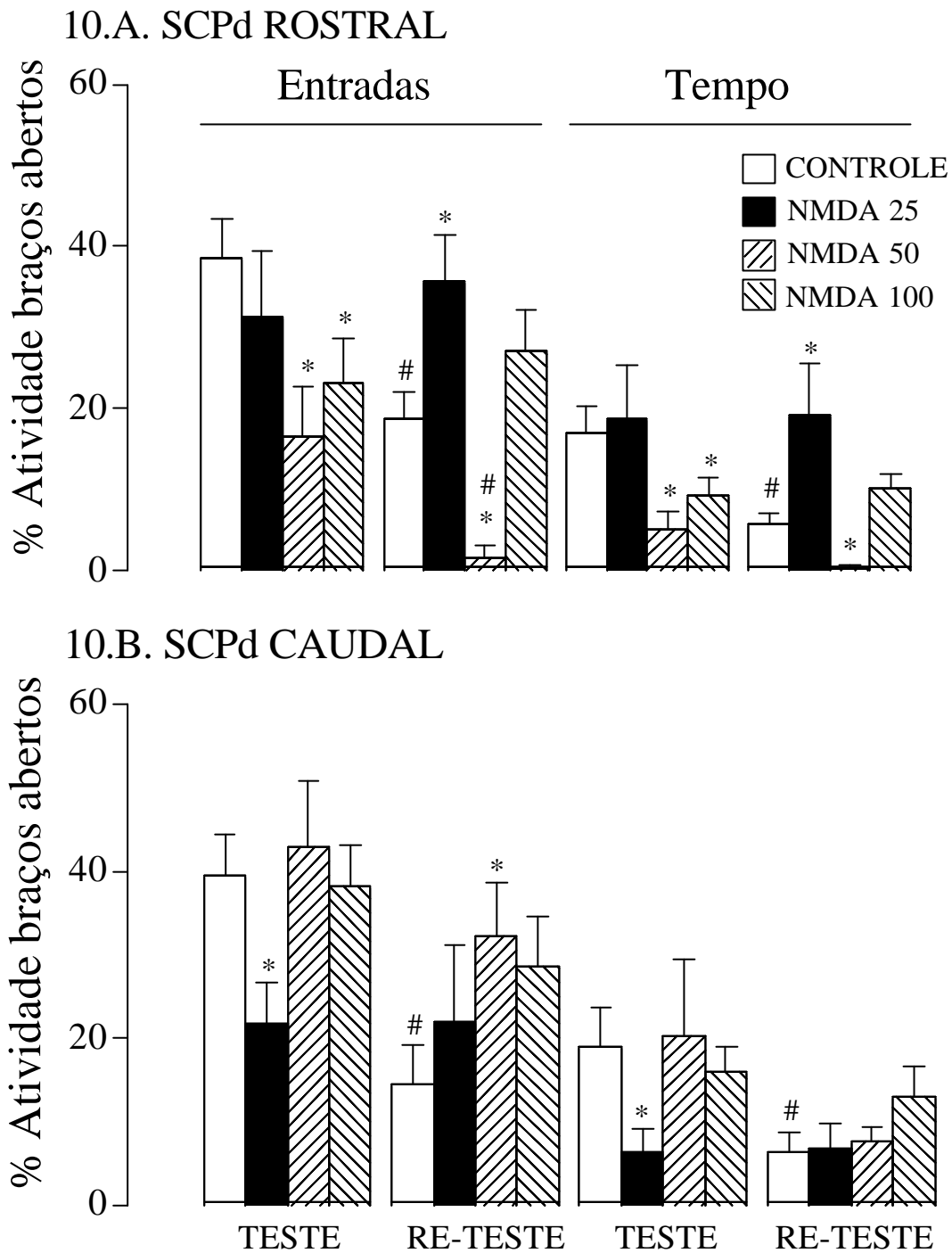


Fig.10. Efeitos na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) após estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de NMDA 25 pmol (n=10 e 9 respectivamente), 50 pmol (n=8 e 12, respectivamente) e 100 pmol (n=10 nas duas áreas), 15 min antes do teste no LCE, comparados com o grupo controle (n=16 nas duas áreas). O re-teste foi realizado 24 h após, sem drogas. Os valores são expressos como médias \pm epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor do respectivo grupo no teste.

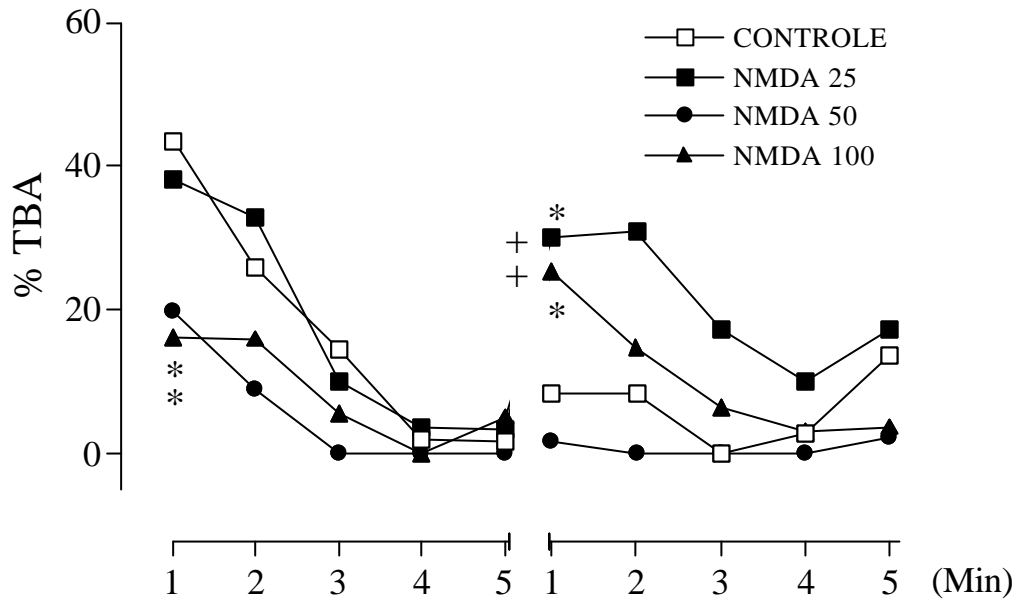
Na Fig.11 podemos observar a %TBA ao longo dos 5 minutos de exposição no teste e no re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.11.A), a ANOVA detectou efeito significativo referente ao tratamento [$F(3,40)=4,48;p<0,05$] e a exposição minuto-a-minuto [$F(9,360)=9,72;p<0,05$] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que, para o grupo controle, há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º e último minuto do teste, sugerindo que há uma aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos e confirmando dados da literatura (Holmes e Rodgers, 1998). O teste *post hoc* também mostrou que, há diminuição ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do teste para o grupo NMDA 50 e 100, quando comparado ao controle. Quando observamos o primeiro minuto do re-teste, podemos verificar que há um aumento significativo ($p<0,05$) na %TBA, para os grupos estimulados com NMDA 25 e 100 pmol no dia anterior, quando comparados com o controle do re-teste. O teste *post hoc* também mostrou que há aumento ($p<0,05$) no 1º minuto do re-teste em relação ao último do teste, para os grupos NMDA 25 e NMDA 100.

Na porção caudal da SCPd (Fig.11.B), a ANOVA detectou efeito da exposição minuto-a-minuto [$F(9,387)=14,72;p<0,05$] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que para o grupo controle há diminuição ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º e último minuto do teste, sugerindo que há uma aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos e confirmando dados descritos anteriormente. O teste *post hoc* também mostrou que há diminuição ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do teste para o

grupo NMDA 25 quando comparado ao controle. Quando observamos o 1º do re-teste podemos verificar que há um aumento significativo ($p < 0,05$) na %TBA para o grupo NMDA 100, quando comparado com o controle do re-teste. O teste *post hoc* também mostrou que há aumento ($p < 0,05$) no 1º minuto do re-teste em relação ao último do teste, para todos os grupos estimulados com NMDA no dia anterior.

11.A. SCPd Rostral



11.B. SCPd Caudal

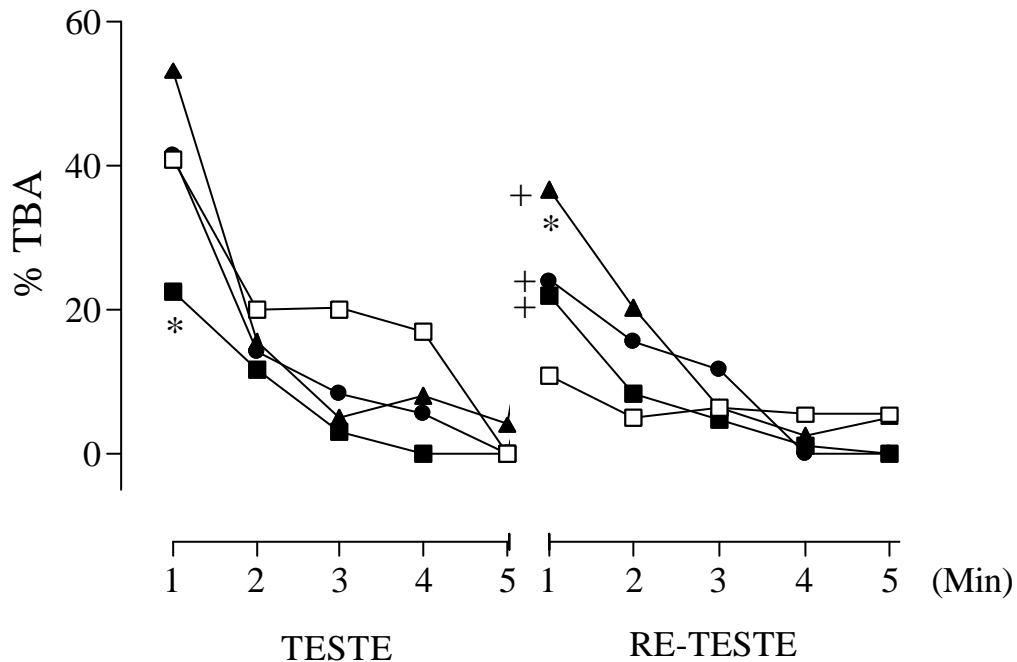


Fig.11. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de NMDA 25 pmol (n=10 e 9 respectivamente), 50 pmol (n=8 e 12, respectivamente) e 100 pmol (n=10 nas duas áreas), 15 min antes do teste no LCE, comparada com o grupo controle (n=16 nas duas áreas). O re-teste foi realizado 24 h após, sem drogas. As curvas representam as médias da %TBA do LCE. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. + $p < 0,05$, diferente significativamente do último minuto do teste.

Na tabela 7, podemos observar os parâmetros complementares, referentes à SCPd rostral.

Com relação a FBF, a ANOVA detectou um efeito referente ao teste/re-teste [$F(1,40)=9,62;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação química com o NMDA não afetou a FBF durante o teste no LCE, mostrando que nas doses de 50 e 100 pmol, o NMDA causou efeito ansiogênico no teste, sem afetar a atividade motora. No re-teste, a FBF mostrou-se aumentada ($p<0,05$) para o grupo controle e para o grupo NMDA 25, quando comparados aos seus respectivos valores no teste. Em contrapartida, o grupo NMDA 50 no re-teste apresentou diminuição na FBF ($p<0,05$), em relação ao controle do re-teste (Tabela 7.A).

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito significativo do tratamento [$F(3,40)=4,83;p<0,05$] e do teste/re-teste [$F(1,40)=6,36;p<0,05$]. O *post hoc* mostrou aumento ($p<0,05$) para o grupo controle no re-teste, quando comparado ao seu respectivo valor no teste. Em contrapartida, o grupo que foi estimulado com NMDA 50 pmol no dia anterior, apresentou diminuição significativa ($p<0,05$) na FT, quando comparado ao controle do re-teste (Tabela 7.B).

A ANOVA detectou efeito significativo no TPC referente ao tratamento [$F(3,40)=5,55;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou aumento ($p<0,05$) na TPC, para o grupo que recebeu estimulação com NMDA na dose não-ansiogênica de 25 pmol, quando comparado com o controle do re-teste. Em contrapartida, o grupo que foi estimulado com NMDA 50 pmol

no dia anterior apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) na TPC quando comparado ao controle do re-teste e ao respectivo valor no teste (tabela 7.C). Assim, podemos dizer que a estimulação com NMDA 50 pmol no dia anterior, teve como consequência comportamental, uma diminuição no TPC, que alguns autores consideram um bom índice de tomada de decisão entre esquiva/aproximação, associado à uma diminuição na FBF, relacionado a locomoção e diminuição na FT, possivelmente relacionada a avaliação de risco.

SCPd rostral		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,4 ± 0,5	6,2 ± 0,6 [#]
NMDA 25	3,9 ± 0,5	6,2 ± 1,3 [#]
NMDA 50	3,7 ± 0,8	4,1 ± 1,1 [*]
NMDA 100	4,5 ± 0,9	6,2 ± 0,9
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,5 ± 0,4	4,7 ± 0,6 [#]
NMDA 25	4,4 ± 1,1	5,6 ± 0,8
NMDA 50	1,5 ± 0,5	2,1 ± 0,7 [*]
NMDA 100	2,8 ± 0,7	3,5 ± 0,6
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	11,5 ± 2,6	16,7 ± 4,6
NMDA 25	30,4 ± 9,2	33,9 ± 5,7 [*]
NMDA 50	20,4 ± 4,7	1,5 ± 0,8 ^{*#}
NMDA 100	13,4 ± 4,2	29,1 ± 8,0
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor no teste.		

Na tabela 8, podemos observar os mesmos parâmetros na SCPd caudal.

A ANOVA detectou efeito significativo na FBF referente ao tratamento [$F(3,43)=4,19;p<0,05$] e ao teste/re-teste [$F(1,43)=5,99;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação química com NMDA 50 pmol provocou uma diminuição significativa ($p<0,05$) na FBF durante o teste, indicando um possível prejuízo motor desta dose que na SCPd caudal não diminuiu a atividade nos braços abertos. Esta diminuição ($p<0,05$) pode ainda ser observada no re-teste, quando comparada ao controle. Em contrapartida, houve aumento significativo ($p<0,05$) na FBF para o grupo NMDA 100, quando comparado com o seu respectivo valor no teste (Tabela 8.A).

Com relação a FT, a ANOVA detectou um efeito referente ao teste/re-teste [$F(1,43)=5,99;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com NMDA não afetou a FT, na porção caudal, no teste ou re-teste no LCE. No re-teste, houve uma aumento significativo ($p<0,05$) na FT somente para o grupo controle, quando comparado ao seu respectivo valor no teste (Tabela 8.B).

A ANOVA não detectou efeito no TPC (tabela 8.C).

TABELA 8. Efeitos da estimulação química com microinjeção de NMDA 25, 50 e 100 pmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.

SCPd caudal		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,1 ± 0,6	5,6 ± 0,7
NMDA 25	3,9 ± 0,4	3,9 ± 0,8
NMDA 50	2,6 ± 0,3*	3,6 ± 0,6*
NMDA 100	4,1 ± 0,4	6,4 ± 0,8 [#]
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	3,1 ± 0,5	4,8 ± 0,7 [#]
NMDA 25	3,1 ± 0,4	4,4 ± 0,8
NMDA 50	3,1 ± 0,5	4,1 ± 0,6
NMDA 100	2,5 ± 0,6	3,9 ± 0,5
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	18,4 ± 5,9	16,7 ± 4,7
NMDA 25	14,1 ± 7,8	11,5 ± 4,4
NMDA 50	43,0 ± 22,4	17,0 ± 4,3
NMDA 100	18,2 ± 4,3	29,8 ± 7,1

OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor no teste.

Na Fig.12 estão representados os dados obtidos após estimulação química com GLY em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.12.A), a ANOVA detectou um efeito na %FBA [$F(1,29)=23,16; p < 0,05$] e na %TBA [$F(1,29)=17,75; p < 0,05$] referente ao teste/re-teste. Há também uma tendência com relação ao tratamento, %FBA: $F(2,29)=2,74; p=0,08$ e na %TBA: $F(2,29)=2,71; p=0,08$. O *post hoc* mostrou que a estimulação com GLY na porção rostral afetou a atividade nos braços abertos durante o teste no LCE. O grupo que recebeu a microinjeção de GLY na dose de 180 nmol mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle, sugerindo efeito

ansiolítico. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle e para o grupo GLY 120, quando comparados com seus respectivos valores no teste.

Na SCPd caudal (FIG.12.B), a ANOVA detectou um efeito na %FEA referente ao teste/re-teste [$F(1,28)=9,17; p < 0,05$] e uma tendência com relação ao tratamento [$F(2,28)=3,29; p = 0,05$]. Com relação à %TBA, a ANOVA detectou efeito referente ao tratamento [$F(2,28)=5,27; p < 0,05$] e ao teste/re-teste [$F(1,28)=4,01; p = 0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com GLY 120 nmol na porção caudal provocou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na atividade nos braços abertos durante o teste no LCE, em relação ao grupo controle, sugerindo um efeito ansiolítico. Na dose maior, a GLY não afetou a atividade nos braços abertos. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que confirma os dados descritos anteriormente.

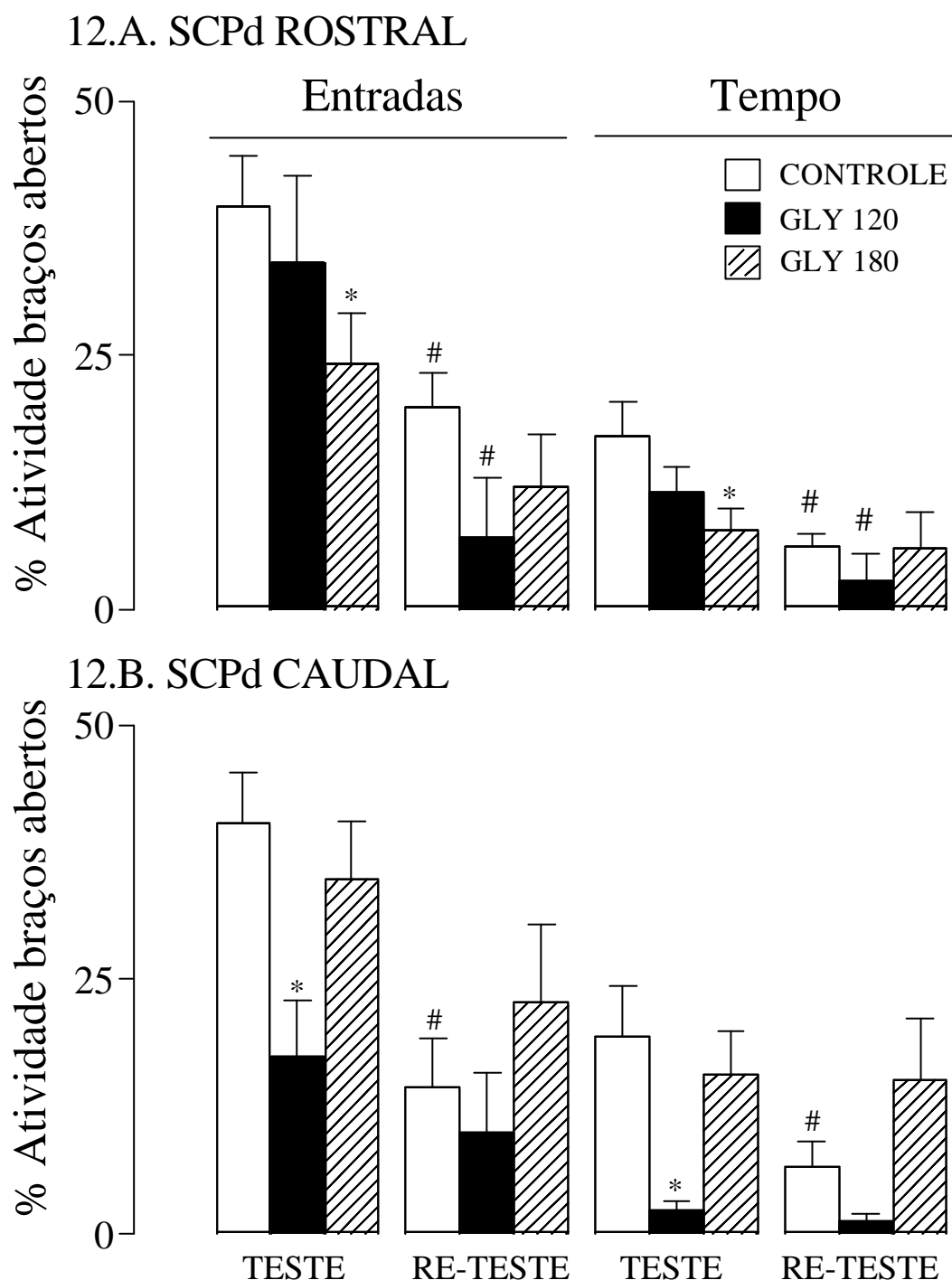


Fig.12. Efeitos na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) após estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de GLY 120 nmol (n=07 nas duas áreas), 180 nmol (n=10 e 9, respectivamente), 15 min antes do teste no LCE, comparados com o grupo controle (n=15 nas duas áreas). O re-teste foi realizado 24 h após, sem drogas. Os valores são expressos como médias \pm epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor do respectivo grupo no teste.

Na Fig.13 podemos observar a %TBA ao longo dos 5 minutos de exposição no teste e no re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.13.A), a ANOVA detectou efeito significativo na %TBA, referente à exposição minuto-a-minuto [$F(9,261)=11,23;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que para o grupo controle há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º e último minuto do teste, sugerindo que há uma aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos, como visto anteriormente. Comparando a %TBA no 1º minuto do grupo controle com os grupos experimentais, o teste *post hoc* mostrou que há diminuição significativa ($p<0,05$) no teste apenas para o grupo GLY 180, quando comparado ao controle.

Na porção caudal da SCPd (Fig.13.B), a ANOVA detectou efeito significativo do tratamento [$F(2,28)=5,05;p<0,05$] e da exposição minuto-a-minuto [$F(9,252)=5,31;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que para o grupo controle há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º e último minuto do teste, sugerindo que há uma aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos e confirmando dados descritos anteriormente. O teste *post hoc* também mostrou que há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do teste para o grupo GLY 120, quando comparado ao controle. Quando observamos o 1º minuto do re-teste podemos verificar que há aumento significativo ($p<0,05$), em relação ao último minuto do teste, para o grupo estimulado com GLY 180 nmol no dia anterior.

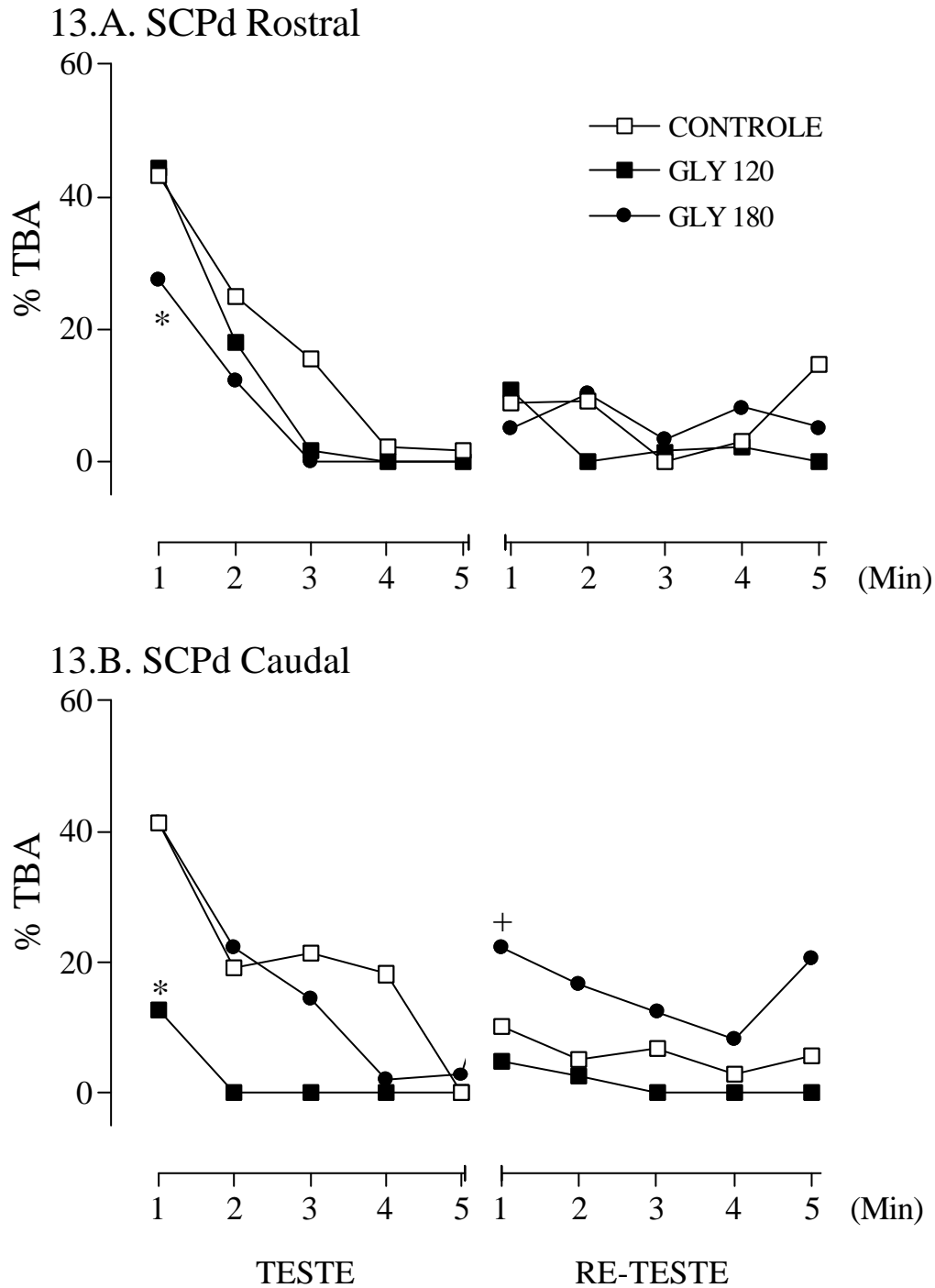


Fig.13. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de GLY 120 nmol (n=07 nas duas áreas), 180 nmol (n=10 e 9, respectivamente), 15 min antes do teste no LCE, comparados com o grupo controle (n=15 nas duas áreas). O re-teste foi realizado 24 h após, sem drogas. As curvas representam as médias da %TBA do LCE. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. + $p < 0,05$, significativamente diferente do último minuto no teste.

Na tabela 9, podemos observar os parâmetros relacionados a atividade geral observados na SCPd rostral.

Com relação a FBF, a ANOVA não detectou diferença entre os grupos, indicando que a estimulação com GLY (120 e 180 nmol) não afetou a atividade locomotora (Tabela 9.A).

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito significativo do teste/re-teste [$F(1,29)=5,51;p<0,05$]. O *post hoc* mostrou aumento na FT, para o grupo GLY 120 ($p=0.05$) e para o grupo GLY 180 ($p<0,05$), quando comparados ao controle, no teste. No re-teste, o grupo controle ($p<0,05$) e o grupo GLY 180 ($p=0,05$) apresentaram aumento quando comparados aos seus respectivos valores no teste (Tabela 9.B).

A ANOVA não detectou efeito significativo no TPC, mostrando que a estimulação química utilizada não afetou o tempo de tomada de decisão (Tabela 9.C).

SCPd rostral		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,2 ± 0,5	6,2 ± 0,7
GLY 120	4,7 ± 1,3	4,4 ± 1,3
GLY 180	3,5 ± 0,7	5,0 ± 0,8
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,4 ± 0,4	4,8 ± 0,6 [#]
GLY 120	4,1 ± 0,9	3,6 ± 0,9
GLY 180	4,0 ± 1,1 [*]	5,7 ± 0,8
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	11,5 ± 2,8	17,4 ± 4,9
GLY 120	11,8 ± 4,5	14,4 ± 7,1
GLY 180	18,8 ± 7,4	10,5 ± 3,1
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p<0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p<0,05$, significativamente diferente do valor no teste.		

Na tabela 10, podemos observar que a ANOVA não detectou efeito significativo nestes parâmetros, mostrando que a estimulação com GLY na SCPd caudal não afetou a atividade geral do animal.

TABELA 10. Efeitos da estimulação química com microinjeção de GLY 120 e 180 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.		
SCPd caudal		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,0 ± 0,7	5,6 ± 0,7
GLY 120	4,0 ± 0,5	3,1 ± 0,5
GLY 180	5,5 ± 1,0	5,3 ± 0,7
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,8 ± 0,4	4,5 ± 0,7
GLY 120	4,1 ± 0,9	4,0 ± 1,1
GLY 180	3,9 ± 1,0	3,0 ± 0,6
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	19,0 ± 6,3	16,4 ± 5,0
GLY 120	6,3 ± 3,5	6,6 ± 2,6
GLY 180	14,4 ± 3,7	23,6 ± 6,7
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm.		

Na Fig.14 estão representados os dados obtidos após estimulação química com DSER em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

Na SCPd rostral (Fig.14.A), a ANOVA detectou um efeito na %FBA, referente ao teste/re-teste [$F(1,32)=5,96;p<0,05$] e uma tendência referente ao tratamento [$F(2,32)=3,00;p=0,06$]. Quanto a %TBA, a ANOVA detectou um efeito significativo no que diz respeito ao tratamento [$F(2,32)=4,0;p<0,05$] e ao teste/re-teste [$F(1,32)=5,43;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com DSER na porção rostral afetou a %FEA e %TBA

durante o teste no LCE, sendo que o grupo que recebeu a microinjeção de DSER na dose de 320 nmol mostrou uma diminuição significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo controle, sugerindo efeito ansiogênico. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle, quando comparado com seu valor no teste, o que confirma que há retenção da resposta de esquia aos braços abertos. Houve também uma diminuição significativa ($p<0,05$) na atividade nos braços abertos, para o grupo que foi estimulado com DSER 160 nmol no dia anterior, quando comparados com seu valor prévio no teste.

Na SCPd caudal (Fig.14.B), a ANOVA detectou um efeito na atividade nos braços abertos quanto ao tratamento [%FBA: $F(2,35)=4,62; p<0,05$ e %TBA: $F(2,35)=5,64; p<0,05$] e teste/re-teste [%FBA: $F(1,35)=25,04; p<0,05$ e %TBA: $F(1,35)=18,74; p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que a estimulação com DSER na porção caudal afetou a atividade nos braços abertos durante o teste no LCE, pois o grupo que recebeu a microinjeção de DSER na dose 160 nmol mostrou uma diminuição significativa ($p<0,05$), em relação ao grupo controle, sugerindo efeito ansiogênico. No re-teste, houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos parâmetros de %FEA e %TBA para o grupo controle e para o grupo DSER 160, quando comparado com seus respectivos valores no teste. O grupo DSER 320 apresentou diminuição significativa ($p<0,05$) na %FBA, quando comparado ao seu valor no teste. É importante destacar que o grupo que recebeu DSER 160 nmol no dia anterior e apresentou efeito ansiogênico no teste, no re-

teste apresentou redução adicional ($p < 0,05$) na resposta de esquiva aos braços abertos, quando comparado com o controle (retenção do perfil ansiogênico), sugerindo a possibilidade de modificações comportamentais duradouras induzidas pela estimulação química da SCPd com DSER, seguida de exposição ao LCE.

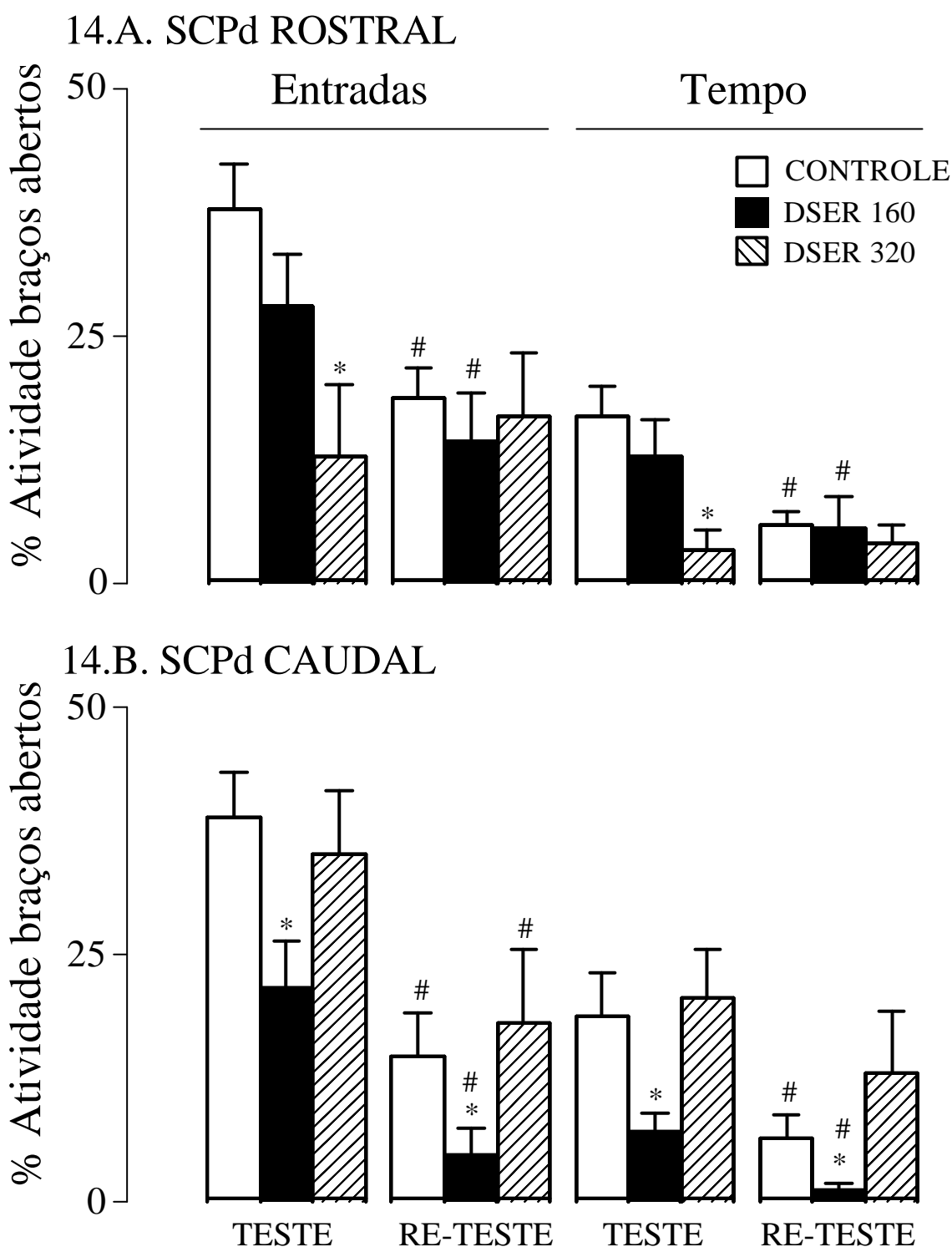


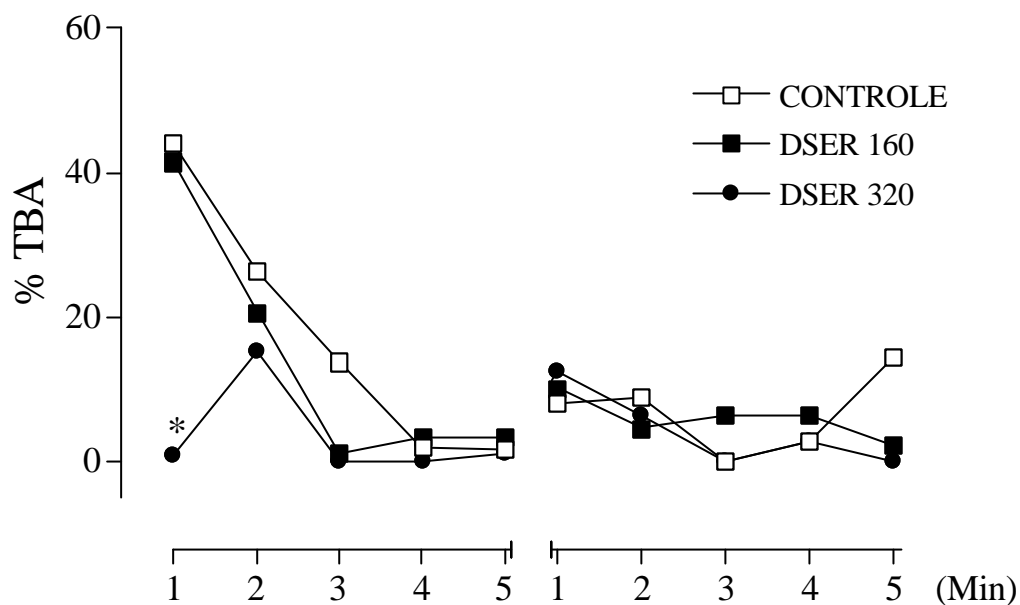
Fig.14. Efeitos na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA) após estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção (0,3 μ l) de DSER 160 nmol (n=11 e 13 respectivamente), 320 nmol (n=7 e 8, respectivamente), 15 min antes do teste no LCE, comparados com o grupo controle (n=17 nas duas áreas). O re-teste foi realizado 24 h após, sem droga. Os valores são expressos como médias \pm epm. * $p < 0,05$, significativamente diferente do grupo controle. # $p < 0,05$, significativamente diferente do valor do respectivo grupo no teste.

Na Fig.15 podemos observar a %TBA ao longo dos 5 minutos de exposição no teste e no re-teste no LCE.

Na porção rostral da SCPd (Fig.15.A), a ANOVA detectou efeito significativo da exposição minuto-a-minuto [$F(9,288)=7,9;p<0,05$] na %TBA. O teste *post hoc* mostrou que para o grupo controle há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º e último minuto do teste, sugerindo que há uma aquisição da resposta de esquiva aos braços abertos, como visto anteriormente. O teste *post hoc* também mostrou que há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA do 1º minuto do teste para o grupo DSER 320, quando comparado ao 1º minuto do controle.

Na SCPd caudal (Fig.15.B), a ANOVA detectou efeito significativo do tratamento [$F(2,35)=5,26;p<0,05$] e da exposição minuto-a-minuto [$F(9,315)=14,35;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que para o grupo controle há diminuição significativa ($p<0,05$) na %TBA entre o 1º e último minuto do teste, como visto anteriormente. O teste *post hoc* também mostrou que há diminuição ($p=0,05$) na %TBA do 1º minuto do teste para o grupo DSER 160, quando comparado ao controle.

15.A. SCPd Rostral



15.B. SCPd Caudal

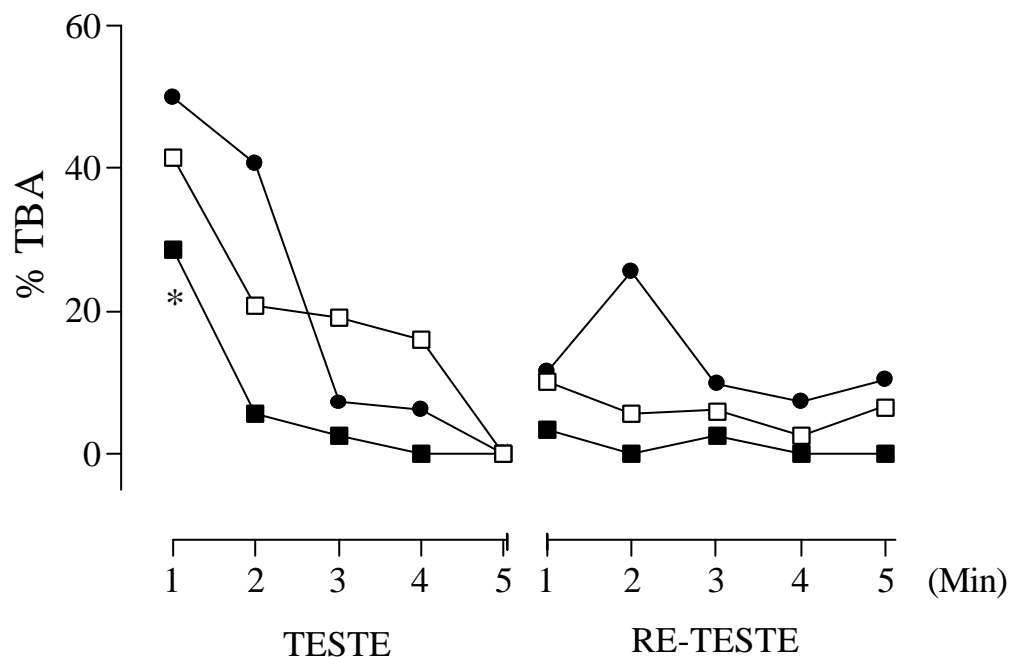


Fig.15. Perfil minuto-a-minuto da %TBA após a estimulação química de áreas rostrais (A) e caudais (B) da SCPd de ratos com microinjeção ($0,3 \mu\text{l}$) de DSER 160 nmol ($n=11$ e 13 respectivamente), 320 nmol ($n=7$ e 8, respectivamente), 15 min antes do teste no LCE, comparados com o grupo controle ($n=17$ nas duas áreas). O re-teste foi realizado 24 h após, sem droga. As curvas representam as médias da %TBA do LCE. * $p<0,05$, significativamente diferente do grupo controle.

Na tabela 11 estão os parâmetros possivelmente relacionados a atividade geral referentes à SCPd rostral.

Com relação a FBF, a ANOVA detectou não detectou diferença significativa entre os grupos (Tabela 11.A).

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito significativo do teste/re-teste [$F(1,32)=8,71;p<0,05$]. O *post hoc* mostrou aumento no re-teste para o grupo controle ($p<0,05$) quando comparado ao seu respectivo valor no teste (Tabela 11.B).

A ANOVA não detectou efeito significativo no TPC (Tabela 11.C).

SCPd rostral		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,6 ± 0,5	6,4 ± 0,6
DSER 160	5,0 ± 0,9	5,2 ± 1,2
DSER 320	3,5 ± 1,1	5,0 ± 0,5
B. FREQUÊNCIA DE TENTATIVAS		
Controle	2,6 ± 0,4	4,8 ± 0,5 [#]
DSER 160	3,0 ± 0,4	5,0 ± 1,3
DSER 320	3,6 ± 0,8	5,8 ± 0,8
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	12,1 ± 2,5	17,4 ± 4,4
DSER 160	12,3 ± 2,4	16,1 ± 7,9
DSER 320	11,8 ± 4,1	13,0 ± 5,4
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. # $p<0,05$, significativamente diferente do valor no teste.		

Na tabela 12, podemos observar os parâmetros de atividade geral na SCPd caudal.

Com relação a FBF, a ANOVA detectou efeito significativo do teste/re-teste [$F(1,35)=13,34;p<0,05$]. O

teste *post hoc* mostrou aumento no re-teste para o grupo controle ($p=0,05$) e para o grupo DSER 320 ($p<0,05$) quando comparados aos seus respectivos valores no teste (Tabela 12.A).

Quanto a FT, a ANOVA detectou efeito significativo do teste/re-teste [$F(1,35)=4,69;p<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou aumento no re-teste para o grupo controle ($p<0,05$) quando comparado ao seu respectivo valor no teste. O teste *post hoc* mostrou também uma diminuição ($p<0,05$) na FT para o grupo estimulado no dia anterior com DSER 160 nmol, quando comparado com o controle no re-teste (Tabela 12.B).

A ANOVA não detectou efeito significativo no TPC (Tabela 12.C).

TABELA 12. Efeitos da estimulação química com microinjeção de DSER 160 e 320 nmol na SCPd caudal, na FBF, na FT e no TPC observados em ratos submetidos ao teste/re-teste no LCE.		
SCPd caudal		
Tratamento	TESTE	RE-TESTE
A. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	4,3 ± 0,6	5,8 ± 0,7 [#]
DSER 160	3,6 ± 0,4	5,1 ± 0,8
DSER 320	4,2 ± 0,5	7,5 ± 1,2 [#]
B. FREQUÊNCIA DE ENTRADA NOS BRAÇOS FECHADOS		
Controle	3,2 ± 0,5	4,9 ± 0,7 [#]
DSER 160	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,6 [*]
DSER 320	3,7 ± 1,0	5,8 ± 1,1
C. TEMPO DE PERMANÊNCIA NA PLATAFORMA CENTRAL		
Controle	18,6 ± 5,6	17,6 ± 4,5
DSER 160	11,6 ± 3,4	4,1 ± 2,7
DSER 320	10,6 ± 3,8	13,0 ± 4,7
OBS. Os dados são expressos na forma de médias ± epm. * $p<0,05$, significativamente diferente do controle. # $p<0,05$, significativamente diferente do valor no teste.		

4.C.4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta etapa (III) mostram que a estimulação química com microinjeções de agonistas do receptores NMDA/GLY_B em áreas rostrais e caudais da SCPd afetam o comportamento de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE.

A estimulação com NMDA produziu uma diminuição na atividade nos braços abertos durante o teste no LCE, sugerindo efeito ansiogênico nas doses mais altas (50 e 100 pmol) na porção rostral e na dose menor (25 pmol) na porção caudal da SCPd. Esta diminuição na atividade nos braços abertos no teste, não foi acompanhada por alterações nos parâmetros de atividade geral (FBF, FT, TPC).

No re-teste, os animais que foram estimulados no dia anterior com NMDA apresentaram padrões diferentes de influência comportamental. O grupo estimulado com NMDA 25 pmol na SCPd rostral que, no teste no LCE não mostrou efeito ansiogênico, no re-teste mostrou aumento na atividade locomotora geral (FBF), aumento no tempo de tomada de decisão (TPC) e aumento na atividade nos braços abertos (%FBA e %TBA). Apesar do perfil comportamental do grupo NMDA 25 na SCPd rostral durante o teste ter sido semelhante ao do grupo controle, as alterações observadas no re-teste indicam que a estimulação pré-teste não foi inócua, o que nos leva a sugerir que a estimulação com o NMDA neste caso pode ter desorganizado processos de elaboração de estratégias envolvidos na retenção da resposta de esquiva, já que a

retenção ocorre para o grupo controle. A não-retenção na resposta de esquiva aos braços abertos, aqui acompanhada de diminuição na FBF, pode também ser observada na SCPd caudal com o grupo NMDA 50 que, no teste apresentou comportamento muito semelhante ao grupo controle e no re-teste apresentou aumento na atividade dos braços abertos.

Na SCPd rostral, o grupo NMDA 50 apresentou efeito ansiogênico durante o teste no LCE, visualizado principalmente no primeiro minuto da exposição ao labirinto, e apresentou retenção do perfil ansiogênico no re-teste. O aparecimento deste perfil ansiogênico acentuado, sem droga, 24 h após, associado à alterações na atividade geral, tais como diminuição da atividade locomotora, pode indicar que a exposição ao labirinto, associada à tal intensidade de estimulação química com o NMDA, pode não somente reforçar o aparecimento de esquiva fóbica, como também provocar um efeito inibitório total sobre o comportamento.

Esses resultados sugerem um efeito ansiogênico do NMDA no teste no LCE, dependente da dose e da área estimulada. Sugerem ainda que a exposição prévia ao labirinto, sob estimulação desta droga pode causar conseqüências comportamentais duradouras detectadas no re-teste e diferenciadas, dependendo do tipo de efeito observado no teste. No entanto, a retenção do perfil ansiogênico no re-teste, acompanhada de outras alterações no comportamento do animal, pode indicar interferência deste agonista nos processos de tomada de decisão e elaboração de estratégias

comportamentais, como a retenção da resposta de esquiiva.

A estimulação com os agonistas seletivos do sítio GLY_B (GLY e DSER) produziu uma diminuição significativa na atividade nos braços abertos durante o teste no LCE, sugerindo efeito ansiogênico das doses maiores (GLY 180 nmol e DSER 320 nmol) na porção rostral da SCPd e das doses menores (GLY 120 nmol e DSER 160 nmol) na porção caudal. Esta diminuição na atividade nos braços abertos foi sempre melhor visualizada no primeiro minuto de exposição ao LCE. Os demais parâmetros no teste não foram afetados no teste por este tipo de estimulação química prévia. No re-teste, foi possível visualizar a retenção do perfil ansiogênico no grupo DSER 160 na SCPd caudal, sem no entanto, alterar os parâmetros de locomoção (FBF) e tomada de decisão (TPC). No grupo GLY 120 também houve diminuição que, no entanto, não apresentou diferença significativa do grupo controle. As doses de GLY e DSER que não apresentaram efeito ansiogênico, afetaram pouco a atividade geral dos animais (somente a DSER na dose 320 nmol na SCPd caudal provocou aumento a FBF durante o re-teste). Esses resultados sugerem que os agonistas do sítio GLY_B do receptor NMDA afetam o comportamento de esquiiva de maneira acentuada.

Aqui nesta etapa de nosso trabalho, observamos novamente que a SCPd rostral requer doses mais altas de agonistas NMDA/GLY_B para desencadear uma resposta de esquiiva (como visto na etapa II). Entretanto, a estimulação com as mesmas doses na SCPd caudal não afetou de maneira

consistente as respostas de conflito e esquiva que podem ser observadas no LCE. Isso talvez ocorra devido a uma mudança no modo de resposta do animal, para um comportamento defensivo que não pode ser detectado utilizando o LCE (como discutido na etapa II). Assim, o aumento nos comportamentos de conflito e esquiva pode não estar diretamente relacionado ao medo e então, níveis moderados de medo poderiam produzir aumento nestas respostas de conflito e esquiva enquanto, níveis elevados de medo produziram outras respostas defensivas, como por exemplo, reação de congelamento ou fuga. A estimulação química com NMDA em doses mais altas têm sido utilizada no estudo de outros comportamentos também relacionados com defesa, como por exemplo, correr e pular (Schenberg et al., 2001). Estudos com estimulação química com agonistas seletivos do sítio GLY_B em outros modelos animais poderiam contribuir para elucidar esta questão.

É importante salientar que este efeito dos agonistas NMDA/GLY_B, diferente entre áreas rostrais e caudais da SCPd, já foi visto anteriormente para o GLU, GLY+GLU (etapa II) e para a GLY (Teixeira e Carobrez, 1999) e pode ser devido ao fato de que as ações destes compostos dependem também das concentrações dos moduladores endógenos que se ligam ao complexo receptor NMDA/GLY_B (Johnson e Ascher, 1987; Kemp e Leeson, 1993; Leeson e Iversen, 1994; Wang e Salter, 1994; Danysz e Parsons, 1998), como já discutido anteriormente.

De maneira geral, podemos dizer que nossos dados, com o NMDA, a GLY e a DSER, revelam que a estimulação química com

agonistas NMDA/GLY_B pode afetar o comportamento de esquiva de maneira dependente da dose e da área-alvo na SCPd e corroboram estudos anteriores que mostram que compostos que interferem com a neurotransmissão dos AAE podem evocar padrões de respostas defensivas diferentes ao longo do eixo rostrocaudal da SCP (Bandler et al., 1985; Bandler e Depaulis, 1991; Teixeira e Carobrez, 1999).

Como citado anteriormente, nos últimos anos, alguns estudos têm mostrado que a pré-exposição ao LCE pode afetar as respostas comportamentais numa segunda exposição (File e Zangrossi, 1993; File et al., 1996; Rodgers et al., 1996; Holmes e Rodgers, 1996; Bertoglio e Carobrez, 2000). Nosso trabalho confirma estes resultados e mostra ainda que, a estimulação química com agonistas NMDA/GLY_B na SCPd pode aumentar o impacto da experiência no LCE, causando um aumento adicional da resposta de esquiva e afetar as estratégias comportamentais empregadas numa segunda exposição ao labirinto. Estes resultados indicam a possibilidade de participação desta estrutura em processos cognitivos subjacentes às respostas aprendidas de medo e, possivelmente, ansiedade (como discutidos na etapa I).

5. DISCUSSÃO GERAL

Desde a década de 80, a participação dos AAE na mediação das reações de defesa e medo evocados na SCPd passou a ser amplamente estudada (Bandler, 1982; Bandler et al., 1985; Krieger e Graeff, 1985; McDougall et al., 1985; Carobrez, 1987).

Como já mencionado, a ativação do receptor NMDA/GLY_B tem sido considerada essencial para muitos tipos de plasticidade sináptica, incluindo aquelas relacionadas à formação de memória, regulação do movimento e dos neurônios sensoriais no córtex visual que regulam o tamanho do campo visual (Wisden et al., 2000). Recentemente, a LTP (Adamec, 2001) e o abrasamento (Omori et al., 2001), fenômenos relacionados à plasticidade neural, foram demonstrados na SCP. Tais características podem estar relacionadas ao aumento do alerta e ao aprendizado de esquiva observados em animais durante a resposta defensiva e, portanto, corroborar a participação do receptor NMDA na mediação do comportamento de defesa. Além disso, o receptor NMDA é formado por uma combinação de subunidades que podem influenciar de maneira diferenciada a afinidade dos muitos moduladores que se ligam a este complexo (Danysz e Parson, 1998), a abertura dos canais iônicos (Monyer et al., 1992) e o tempo do potencial de ação pós-sináptico, que determina a janela de detecção de coincidência, processo importante na participação do NMDA no aprendizado (Tsien, 2000; Da-Rocha et al., 2001).

Devido à possibilidade de ações excitotóxicas de agonistas seletivos do sítio do GLU (na subunidade NR2), muitos autores têm utilizado compostos seletivos para o sítio GLY_B (subunidade NR1), acoplado ao receptor NMDA (Olney, 1994), que parecem facilitar a atividade do receptor NMDA de uma maneira mais sutil (Walker *et al.*, 2002).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que a microinjeção de GLY apresenta efeito ansiogênico dependente da dose e da área-alvo na SCPd, em ratos submetidos ao teste no LCE (Teixeira, 1997). Experimentos com HA966 (composto com ação antagônica no sítio GLY_B) associado à GLY, mostraram seletividade farmacológica para os efeitos da GLY nos receptores GLY_B acoplados ao NMDA (Teixeira e Carobrez, 1999).

Nossos trabalhos anteriores, associados aos dados da literatura mostrando que a exposição ao LCE pode ativar neurônios da SCPd (Silveira *et al.*, 1993) e que o re-teste no LCE poderia ser um modelo útil para estudar respostas aprendidas de medo (File *et al.*, 1996), foram determinantes para o presente trabalho.

Na primeira etapa desse estudo procuramos verificar a influência da inativação temporária com lidocaína na SCPd (pré-teste) sobre os comportamentos observados no teste e no re-teste no LCE. Os resultados obtidos sugerem que a SCPd pode influenciar o aprendizado da resposta de esquiva que ocorre durante a primeira exposição ao LCE, posto que a inativação da SCPd no teste abole a retenção dessa resposta

de esquiva e a expressão de uma resposta mais acentuada de medo observada no re-teste neste modelo.

A análise temporal da %TBA do grupo controle exposto ao LCE mostrou uma diminuição gradativa deste parâmetro ao longo dos minutos da exposição teste, sugerindo aumento gradual na resposta de esquiva aos braços abertos ao longo do tempo. No re-teste, esse grupo apresenta retenção dessa resposta de esquiva. Tais resultados sugerem que, após uma exploração inicial, há o desenvolvimento de estratégias de esquiva que determinam um aumento na resposta de medo na segunda exposição, como já descrito (Rodgers *et al.*, 1996; Holmes e Rodgers, 1998; Bertoglio e Carobrez, 2000).

Esses resultados depõem a favor da adoção da análise minuto-a-minuto no LCE, visto que, tal avaliação temporal pode contribuir para um melhor entendimento do perfil comportamental dos animais submetidos a este modelo.

Numa segunda etapa do nosso estudo, passamos a estudar o papel da ativação do receptor NMDA/GLY_B da SCPd na mediação do comportamento defensivo. Para tanto, utilizamos diferentes agonistas do receptor NMDA/GLY_B microinjetados em áreas rostrais e caudais da SCPd de ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE. No re-teste, nosso objetivo foi tentar identificar conseqüências comportamentais da experiência prévia neste modelo, associada à estimulação química com diferentes agonistas do receptor NMDA/GLY_B.

A estimulação com o GLU mostrou efeito ansiogênico no teste no LCE, dependente da dose e restrito à porção caudal

da SCPd, reproduzindo o perfil comportamental observado com a GLY microinjetada na dose 120 nmol, em estudos realizados anteriormente nesse laboratório (Teixeira e Carobrez, 1999). No entanto, é importante lembrar que o GLU atua em outros receptores não-NMDA também presentes na SCPd, como o AMPA, o Kainato e os metabotrópicos (Albin *et al.*, 1990). Quanto aos receptores metabotrópicos, estudos recentes têm contribuído para um melhor entendimento de seus subgrupos, sistemas de transdução de sinal e farmacologia (Pin e Duvoisin, 1995). Alguns autores sugerem que estes receptores podem estar presentes no terminal pré-sináptico onde o GLU pode atuar inibindo a sua própria neurotransmissão (Chen *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2002). Entretanto, o papel destes no comportamento defensivo mediado pela SCPd ainda não está bem estabelecido.

A associação GLY-GLU mostrou efeito ansiogênico na dose menor na porção rostral, sugerindo a possibilidade de interação entre agonista e co-agonista do complexo receptor NMDA/GLY_B, modulando as respostas comportamentais evocadas pela ativação deste receptor. A associação de GLY ao GLU possivelmente favoreceu a atuação do GLU no receptor NMDA e mostrou que a SCPd rostral também pode participar da elaboração de comportamentos de esquia detectados durante o teste no LCE, sugerindo a necessidade de concentrações maiores de agonistas para desencadear tais comportamentos nesta porção. Juntos, esses resultados revelam que a estimulação química com GLU ou GLY-GLU pode afetar os

comportamentos de esquiva e conflito de maneira dependente da dose e da área-alvo na SCPd e reforçam estudos anteriores que mostram que as respostas de defesa podem variar ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd após a estimulação com compostos que interferem com ativação do complexo-receptor NMDA/GLY_B (Bandler *et al.*, 1985; Bandler e Depaulis, 1991; Teixeira e Carobrez, 1999).

O passo seguinte foi a estimulação química com agonistas seletivos para o sítio glutamatérgico na subunidade NR2 (NMDA) e para o sítio GLY_B na subunidade NR1 (GLY e DSER) do complexo receptor NMDA/GLY_B.

Os resultados obtidos mostram efeito ansiogênico do NMDA no teste no LCE, dependente da dose e da área estimulada (dose menor, ansiogênico na SCPd caudal; doses maiores, ansiogênico na SCPd rostral). Indicam ainda que a exposição prévia ao labirinto, sob estimulação de tal droga, pode causar conseqüências comportamentais duradouras e diferenciadas no re-teste, dependendo do tipo de efeito observado no teste, sugerindo que a estimulação química com este agonista pode não somente afetar o comportamento de esquiva, como também a atividade geral do animal.

Em contrapartida, os resultados obtidos com agonistas seletivos do sítio GLY_B mostram que este tipo de estimulação química parece afetar os índices de esquiva no teste (doses menores, efeito ansiogênico na SCPd caudal; doses maiores, efeito ansiogênico na SCPd rostral), e favorecer a retenção da resposta de esquiva no re-teste, sem interferir nos

parâmetros de atividade geral.

Estes resultados encontram-se resumidos na tabela 13.

TABELA 13. Principais eventos comportamentais observados em ratos submetidos ao teste e re-teste no LCE, após diferentes tratamentos em áreas rostrais e caudais da SCPd.

Tratamento	Esquiva		Avaliação de risco		Tomada de Decisão		Locomoção	
	T	R	T	R	T	R	T	R
SCPd rostral								
Lidocaína	-	↓	-	↑	↑	↑	-	-
GLU 20	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU 40	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY-GLU 20	↑	-	-	↑	-	-	-	-
GLY-GLU 40	↑	-	-	-	-	-	-	-
NMDA 25	-	↓	-	-	-	↑	-	-
NMDA 50	↑	↑	-	↑	-	↓	-	↓
NMDA 100	↑	-	-	-	-	-	-	-
GLY 120	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY 180	↑	-	-	-	-	-	-	-
DSER 160	-	-	-	-	-	-	-	-
DSER 320	↑	-	-	-	-	-	-	-
SCPd caudal								
Lidocaína	-	↓	-	↑	-	↑	-	-
GLU 20	↑	-	-	-	-	-	-	-
GLU 40	-	-	-	-	↑	-	-	-
GLY-GLU 20	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY-GLU 40	-	-	-	-	-	-	-	-
NMDA 25	↑	-	-	-	-	-	-	-
NMDA 50	-	↓	-	-	-	-	↓	↓
NMDA 100	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY 120	↑	-	-	-	-	-	-	-
GLY 180	-	-	-	-	-	-	-	-
DSER 160	↑	↑	-	↑	-	-	-	-
DSER 320	-	-	-	-	-	-	-	-

OBS. Esquiva - relacionada à atividade nos braços abertos; Conflito - relacionado ao IC; tomada de decisão - relacionado ao TPC e locomoção - relacionado à FBF. T= teste; R= re-teste; ↓= diminuição no comportamento; ↑= aumento no comportamento; - = sem efeito

Podemos dizer que nossos dados revelam que a ativação do complexo-receptor NMDA/GLY_B pode afetar os comportamentos

de esquiava de maneira não homogênea ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd, e os agonistas NMDA/GLY_B podem apresentar efeitos dependentes da dose e do área-alvo na SCPd. Esses resultados devem-se possivelmente ao fato de que as ações destes compostos dependem também da concentração dos agonistas endógenos ligantes deste receptor (Johnson e Ascher, 1987; Kemp e Leeson, 1993; Czepita *et al.*, 1996; Wilcox *et al.*, 1996; Schell *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 1998; Danbolt, 2001).

Como mencionado anteriormente, embora a interação entre as subunidades do receptor NMDA/GLY_B ainda não esteja totalmente entendida (Nahum-Levy *et al.*, 2001), a literatura sugere que para que esse complexo-receptor seja funcional, ele deva ter a combinação de pelo menos uma subunidade NR1 com uma NR2 (Danysz e Parson, 1998; Dingledine *et al.*, 1999). No entanto, há também relatos que diferentes combinações de subunidades podem resultar em diferenças na afinidade dos agonistas pelos seus respectivos sítios nesse receptor (Priestley *et al.*, 1995; Buller e Monaghan, 1997).

A literatura também revela controvérsias quanto à saturação da GLY no receptor GLY_B acoplado ao NMDA (Wood, 1995; Fedele *et al.*, 1997; Schell *et al.*, 1997; Danysz e Parsons, 1998; Dingledine *et al.*, 1999). Alguns autores relatam que a concentração endógena da GLY na fenda sináptica pode ser reduzida por mecanismos eficientes de transporte ativo (Zafra *et al.*, 1995; Supplisson e Bergman, 1997; Berger *et al.*, 1998; Bergeron *et al.*, 1998). Contudo,

cumprir observar que, os fatores desencadeantes deste processo não estão compreendidos o bastante. Em adição, a ligação ao sítio GLY_B pode ser regulada por vários moduladores endógenos, tais como o ácido quinurênico (antagonista do receptor GLY_B) ou o zinco, que diminui a afinidade da GLY pelo seu sítio (Danysz e Parson, 1998).

Uma hipótese para explicar as ações diferenciadas dos agonistas NMDA/GLY_B aqui utilizados seria uma diferença rostrocaudal na distribuição das combinações das subunidades desse receptor. Outra hipótese seria a de que, a saturação da GLY pode apresentar variações ao longo do eixo da SCPd. Uma terceira alternativa, seria uma ação diferenciada por parte dos transportadores responsáveis pela recaptação da GLY. Enfim, o receptor NMDA/GLY_B pode sofrer influências diferenciadas ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd por parte dos seus moduladores endógenos, que poderiam resultar em diferenças na mediação do comportamento defensivo por ativação desse tipo de receptor na SCPd. No entanto, tais hipóteses somente podem ser confirmadas com estudos autorradiográficos, eletrofisiológicos e imunohistoquímicos.

No literatura, estudos com anticorpo contra a enzima NOS (Onstott *et al.*, 1993) e histoquímica usando NADPH-diaforase (Saper, 1995; Paxinos *et al.*, 1999), mostraram a presença de uma marcação bem definida na SCPd, crescente do polo rostral para o caudal. Sendo que, o receptor NMDA parece estar envolvido na produção de NO (Paakkari e Lindsberg, 1995), tais achados corroboram nossos resultados,

que indicam a possibilidade de diferença na ativação do receptor NMDA ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd.

Numa visão hierárquica do comportamento defensivo, como proposta por alguns autores (Graeff, 1981; Deakin e Graeff, 1991; Gray e McNaughton, 2000; Schenberg *et al.*, 2001), intensa ativação da SCPd, com estimulação elétrica ou com doses altas de GLU ou NMDA, poderia sobrepor o controle do sistema defensivo e desencadear um comportamento tipo-pânico, que é uma reação exacerbada de defesa. Por outro lado, baixa frequência de estimulação elétrica ou baixas doses destes agonistas na SCPd poderia desencadear comportamentos mais sutis ou elaborados de defesa (Carobrez *et al.*, 2001).

Atualmente, evidências comportamentais, autonômicas, endócrinas e farmacológicas, indicam a SCPd como uma estrutura-chave na 'fuga não direcionada'. Por conseguinte, foi proposto um papel para essa estrutura na ansiedade, e mais especificamente, no ataque de pânico (Graeff, 1981; Jenck *et al.*, 1995; Gray e McNaughton, 2000; Schenberg *et al.*, 2001). Entretanto, cabe lembrar que o Distúrbio de Pânico vai além dos ataques súbitos de pânico, sendo clinicamente um fenômeno que inclui os ataques agudos de pânico, ansiedade antecipatória e esquiva fóbica (Coplan e Lydiard, 1998). Logo, diferentes estruturas neurais podem estar envolvidas com os diferentes aspectos dessa doença. Ou ainda, áreas rostrais e caudais da SCP, que apresentam

tantas diferenças no que diz respeito à imunorreatividade celular, densidade de receptores e padrão de comportamento evocado (para revisão ver Carobrez *et al.*, 2001), poderiam participar de fases distintas dessa síndrome.

Nos últimos anos foram feitas algumas tentativas de relacionar os comportamentos defensivos animais com diferentes transtornos de ansiedade (Graeff, 1981; File *et al.*, 1998; Adamec *et al.*, 1999; Gray e McNaughton, 2000), tarefa bastante difícil devido ao caráter multifacetado da própria ansiedade (Andreatini *et al.*, 2001).

Nossos resultados evidenciam que a ativação do sítio GLY_B no receptor NMDA é capaz de provocar um aumento seletivo nos comportamentos de esquia detectados no teste no LCE e reforçar a retenção da resposta de esquia aos braços abertos no re-teste. Estas observações mostram que, a SCPd pode influenciar os processos cognitivos subjacentes a respostas aprendidas de medo. Tais respostas parecem ter importância clínica em muitas condições classificadas como distúrbios de ansiedade (DSM IV), tais como pânico, fobias específicas e transtorno de estresse pós-traumático (Morgan *et al.*, 1995; Fyer, 1998; Gorman *et al.*, 2000).

Alguns autores sugerem que a ativação do receptor NMDA pode desencadear LTP e produzir mudanças no funcionamento do sistema límbico. Essas mudanças límbicas podem estar envolvidas no aumento persistente nos comportamentos do tipo-ansiedade que ocorrem após situações estressantes e aversivas (Adamec, 1997; Adamec *et al.*, 1999, Carobrez *et*

al., 2001). É possível que a experiência no LCE associada à estimulação química da SCPd, possa resultar em um efeito duradouro detectado no re-teste, demonstrando que a SCPd pode influenciar a aquisição de respostas aprendidas de medo, um tipo de resposta defensiva mais orientada e cognitiva. Essa possibilidade só existe porque a SCP possui conexões recíprocas com diversas estruturas relacionadas ao sistema límbico prosencefálico (Nauta, 1958) e, apesar de durante muitos anos a SCP ser vista como distante das influências corticais e cognitivas, estudos neuroanatômicos realizados na última década têm contribuído para mudar esse quadro (Shipley et al., 1991; Rizvi et al., 1991; 1992).

Neste sentido, os experimentos discutidos no presente trabalho destacam a importância da SCPd em comportamentos defensivos mais sutis, como a resposta de esquiva fóbica, possivelmente relacionada a ansiedade, e mostram que essa estrutura pode participar da aquisição e retenção de respostas aprendidas de medo.

Nossos resultados mostram também evidências de que a estimulação química com agonistas seletivos do sítio GLY_B no receptor NMDA pode ser uma ferramenta útil no estudo do papel da ativação dos receptores NMDA/GLY_B da SCPd na mediação do repertório de defesa e comportamentos tipo medo, possivelmente relacionados com a ansiedade e seus diferentes aspectos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A SCP é uma estrutura complexa e heterogênea. Quando levamos em consideração suas dimensões dorsoventral, mediolateral e rostrocaudal, podemos verificar que há uma grande diversidade de conexões neuronais (Beitz, 1982; Rizvi *et al.*, 1991; 1992; Chen e Aston-Jones, 1996), diferenças na quantidade de células gliais (Meller e Dennis, 1990), na imunorreatividade celular (Valverde-Navarro *et al.*, 1996; Lonstein e Stern, 1997; Vander-Horst *et al.*, 1998), na densidade de receptores (Murphy *et al.*, 1999) e funções (Bandler *et al.*, 1991a; 1991b; Fanselow, 1991; Behbehani, 1995; Beitz, 1995).

As observações pioneiras de que a estimulação da SCPd produz aversão em animais (Hunsperger, 1956; Fernandez-de-Molina e Hunsperger, 1959, 1962) e medo/ansiedade em humanos (Nashold *et al.*, 1969) foram um indicador bastante eficiente de que essa região é um importante elo no circuito cerebral processador do medo e da ansiedade (Behbehani, 1995). Nos últimos anos, vários estudos corroboraram esta hipótese e é inegável o valor que a resposta defensiva produzida por estimulação elétrica e química da SCPd (Bandler *et al.*, 1985; Bandler, 1988; Graeff *et al.*, 1988; Bandler e Depaulis, 1991) tem no entendimento dos processos aversivos, comportamento defensivo e, possivelmente, no medo/ansiedade e no pânico (Schenberg e Graeff, 1978; Graeff, 1981; Graeff, 1991; Graeff *et al.*, 1993).

Estudos recentes mostram que as respostas de defesa podem variar qualitativamente ao longo do eixo rostrocaudal da SCP após a estimulação com compostos que interferem na neurotransmissão por AAE (Bandler *et al.*, 1985; Bandler e Depaulis, 1991; Teixeira e Carobrez, 1999; Carobrez *et al.*, 2001).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que a SCPd pode influenciar o aprendizado da resposta de esquiva que ocorre durante a primeira exposição ao LCE, dado que a inativação temporária da SCPd no teste impede a retenção dessa resposta e a expressão de um comportamento mais acentuado de medo observado no reteste no LCE.

Nossos dados revelam que a ativação do complexo-receptor NMDA/GLY_B pode afetar os comportamentos de conflito e esquiva ao longo do eixo rostrocaudal da SCPd e os agonistas NMDA/GLY_B podem apresentar efeitos dependentes da dose e do área-alvo na SCPd. É importante destacar que tanto áreas rostrais como caudais da SCPd podem participar na mediação destes comportamentos detectados durante o teste no LCE, no entanto, a SCPd caudal parece ser mais sensível à estimulação química.

Os resultados obtidos com a estimulação química com agonistas seletivos do sítio GLY_B no receptor NMDA mostraram que estes agonistas são capazes de provocar um aumento nos comportamentos de esquiva detectados no teste no LCE e favorecer a retenção da resposta de esquiva aos braços

abertos no re-teste. Esta observação reforça uma possível participação da SCPd em processos cognitivos subjacentes a respostas aprendidas de medo.

Sabendo que a ativação do receptor NMDA/GLY_B pode ser modulada de diferentes maneiras, possíveis diferenças rostrocaudais na distribuição das combinações das subunidades deste receptor (Priestley *et al.*, 1995; Buller e Monaghan, 1997), na saturação da GLY (Schell *et al.*, 1997; Danysz e Parsons, 1998; Dingledine *et al.*, 1999) ou na localização dos transportadores responsáveis pela recaptação da GLY (Zafra *et al.*, 1995; Supplisson e Bergman, 1997; Berger *et al.*, 1998; Bergeron *et al.*, 1998) poderiam estar contribuindo para os nossos resultados. Evidências de uma marcação dorsolateral, bem definida e crescente, para a NOS e para a NADPH na SCP (Onstott *et al.*, 1993; Saper, 1995; Paxinos *et al.*, 1999), dão um certo suporte à possibilidade de ativação diferenciada do receptor NMDA/GLY_B ao longo do eixo rostrocaudal da SCP.

Enfim, nosso trabalho aponta a importância da SCPd em comportamentos defensivos como a resposta de esquiva/medo e sugerem que esta estrutura pode influenciar a aquisição e retenção de respostas aprendidas de medo.

Nossos resultados mostram a possibilidade de se usar a estimulação química com agonistas do sítio GLY_B, como um ferramenta útil no estudo do envolvimento dos receptores NMDA/GLY_B no repertório de defesa e comportamentos tipo medo, possivelmente relacionados com a ansiedade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamec R. Does long term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress?--Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by predator stress. *Behav. Brain Res.* 2001;120(2):111-135.
- Adamec R. Transmitter systems involved in neural plasticity underlying increased anxiety and defense _ Implications for understanding anxiety following traumatic stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997;21(6):755-765.
- Adamec RE, Burton P, Shallow T, Budgell J. NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure _ Implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Physiol. Behav.* 1999;65(4-5):723-737.
- Adams DB. Brain mechanisms for offense, defense and submission. *Behavioral Brain Science* 1979;2:201-241.
- Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth Z, Dure IV LS, Penney JB, Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci. Lett.* 1990;118:112-115.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of psychiatric disorders. 1995, 4th edn (DSM-IV). APA press, Washington, DC.
- Andreatini R, Blanchard C, Blanchard R, Brandão ML, Carobrez AP, Griebel G, Guimarães FS, Handley SL, Jenck F, Leite JR, Rodgers J, Schenberg LC, Da-Cunha C, Graeff FG. The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001;34:145-154.
- Anthony EW, Newins ME. Anxiolytic-like effects of N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor ligands in the rat potentiated startle test. *Eur. J. Pharmacol.* 1993;250:317-324.
- Bandler R, Depaulis A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, 1991. p.175-198.
- Bandler R, Keay KA. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. In: Holstege G, Bandler R, Saper CB, editors. *Progress in Brain Research*, Vol. 107, chapter 17. Amsterdam: Elsevier Science, 1996. p.285-300.
- Bandler R, Prineas S, McCulloch T. Further localization of midbrain neurones mediating the defence reaction in the cat by microinjections of excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.* 1985;56(3):311-316.

- Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci.* 1994;17(9):379-389.
- Bandler R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region. In: Epstein A, Morrison A, editors. *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*. New York: Academic Press, 1988.p.67-154.
- Bandler R. Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. *Neurosci. Lett.* 1982;30(2):183-188.
- Bandler_a R, Carrive P, Depaulis A. Introduction - Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, 1991. p.1-8.
- Bandler_b R, Carrive P, Zhang SP. Integration of somatic and automatic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatopic and functional organization. *Prog. Brain Res.* 1991;87:269-305.
- Batista-Da-Silva AP, Rae GA, Carobrez AP. Microinjection of D-2-amino-7-phosphonoheptanoate into the dorsal periaqueductal gray matter reduces the pressor response to glutamate injected at the same site. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1990;23(8):705-708.
- Beart PM, Nicolopoulos LS, West DC, Headley PM. An excitatory amino acid projection from ventromedial hypothalamus to periaqueductal gray in the rat: autoradiographic and electrophysiological evidence. *Neurosci. Lett.* 1988;85:205-211.
- Beckett SR, Duxon MS, Aspley S, Marsden CA. Central c-fos expression following 20kHz/ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Brain Res. Bull.* 1997;42(6):421-426.
- Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.* 1995;46:575-605.
- Beitz AJ, Shepard RD. The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A golgi analysis. *J. Comp. Neurol.* 1985;237:460-475.
- Beitz AJ. Periaqueductal gray. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. Second edition. San Diego: Academic Press, 1995. p.173-182.
- Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 1982;7:133-159.
- Bennett DA, Amrick CL. Antagonists at the N-methyl-D-aspartate receptor produce anticonflict effects. In: *Excitatory amino acid transmission*. New York, 1987.p.213-216.
- Berger AJ, Dieudonné S, Ascher P. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptor of excitatory synapses. *J. Neurophysiol.* 1998;80:3336-3340.

- Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(26):15730-15734.
- Bertoglio LJ, Carobrez AP. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.* 2000;108(2):197-203.
- Bertoglio, LJ, Carobrez, AP. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav. Brain Res.* 2002; 132:135-143.
- Blanchard DC, Blanchard R.J, Carobrez AP, Veniegas R, Rodgers RJ, Shepherd JK. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. *Psychopharmacology* 1992;108:352-362.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1990;14:455-462.
- Blanchard RJ, Blanchard DC. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 1989;13:13-14.
- Bovier P, Broekkamp CL, Lloyd KG. Enhancing GABAergic transmission reverses the aversive state in rats induced by electrical stimulation of the periaqueductal grey region. *Brain Res.* 1982;248(2):313-320.
- Buller AL, Monaghan DT. Pharmacological heterogeneity of NMDA receptors: characterization of NR1a/NR2D heteromers expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol.* 1997;320(1):87-94.
- Cameron AA, Khan IA, Westlund KN, Cliffer KD, Willis WD. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. *J. Comp. Neurol.* 1995;351(4):568-584.
- Campeau S, Falls WA, Cullinan WE, Helmreich DL, Davis M, Watson SJ. Elicitation and reduction of fear: behavioural and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene c-fos. *Neuroscience* 1997;78(4):1087-1104.
- Canteras NS, Goto M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* 1999;10(2):413-418.
- Canteras NS, Swanson LW. The dorsal premammillary nucleus: an unusual component of the mammillary body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(21):10089-10093.
- Carobrez AP, Schenberg LC, Graeff FG. Neuroeffector mechanisms of the defense reaction in the rat. *Physiol. Behav.* 1983;31(4):439-444.

- Carobrez AP, Teixeira KV, Graeff FG. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine_B receptor. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001;25:697-709.
- Carobrez AP. Mediação da reação de defesa por aminoácidos excitatórios. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1987.
- Carrive P, Schmitt P, Karli P. Flight induced by microinjection of D-tubocurarine o a-bungarotoxin into medial hypothalamus or periaqueductal gray matter: cholinergic or GABAergic mediation? *Behav. Brain Res.* 1986;22:233-248.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton AS, Zhang D. Excitatory glycine receptors containin the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 2002;415:793-798.
- Chen CY, Ling EH, Horowitz JM, Bonham AC. Synaptic transmission in nucleus tractus solitarius is depressed by Group II and III but not Group I presynaptic metabotropic glutamate receptors in rats. *J Physiol* 2002;538(3):773-86.
- Chen S, Aston-Jones G. Extensive projections from the midbrain periaqueductal gray to the caudal ventrolateral medulla: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience* 1996;71(2):443-459.
- Collingridge GL, Lester RAJ. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 1989;40:143-210.
- Conti F, Barbaresi P, Fabri M. Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivision in the rat periaqueductal gray matter. *Neuroscience* 1988;24:629-633.
- Coplan JD, Lydiard RB. Brain circuits in panic disorder. *Biol. Psychiatry.* 1998;44(12):1264-76.
- Corbett R, Dunn RRW. Effects of HA-966 on conflict, social interaction, and plus-maze behaviors. *Drug Development Res.* 1991;24:201-203.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 1988;11:61-80.
- Czepita D, Daw NW, Reid SN. Glycine at the NMDA receptor in cat visual cortex: saturation and changes with ages. *J. Neurophysiol.* 1996;75(1):311-317.
- Da-Costa-Gomes TM, Chandler SD, Behbehani MM. The role of the basolateral nucleus of the amygdala in the pathway between the amygdala and the midbrain periaqueductal gray in the rat. *Neurosci. Lett.* 1996;214:5-8.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 2001;65(1):1-105.

- Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: Physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol. Rev.* 1998;50:597-664.
- Da-Rocha AF, Pereira-JR A, Coutinho FAB. N-methyl-D-aspartate channel and consciousness: from signal coincidence detection to quantum computing. *Prog. Neurobiol.* 2001;64:555-573.
- Deakin JFW, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol* 1991;5:305-315.
- Delorey TM, Olsen RW. GABA and Glycine. In: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P, editors. *Basic Neurochemistry*. 4th ed. New York: Raven Press, 1989.p. 389-399.
- De-Souza MM, Schenberg LC, Carobrez AP. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxioselective drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain Res.* 1997;90:157-165.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS. 'When a rat smells a cat': the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 2001;104(4):1085-1097.
- Dietrich D, Kral T, Clusmann H, Friedl M, Schramm J. Presynaptic group II metabotropic glutamate receptors reduce stimulated and spontaneous transmitter release in human dentate gyrus. *Neuropharmacology* 2002;42(3):297-305.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 1999;51(1):7-61.
- Edwards SB, Flynn JP. Corticospinal control of striking in centrally elicited attack behavior. *Brain Res.* 1972;41(1):51-65.
- Eisenberg E, Pud D. Can patients with chronic neuropathic pain be cured by acute administration of the NMDA receptor antagonist amantadine? *Pain* 1998;74:337-339.
- Endler JA. Defence against predators. In: *Predator-prey relationships*. University of Chicago Press, Chicago, 1986;p.109-134.
- Fanselow MS. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, 1991. p.151-173.
- Fedele E, Bisaglia M, Raiteri M. D-serine modulates the NMDA receptor/nitric oxide/cGMP pathway in the rat cerebellum during in vivo microdialysis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1997;355(1):43-47.
- Fedynyshyn JP, Kwiat G, Lee NM. Characterization of high affinity opioid binding sites in rat periaqueductal gray P2 membrane. *Eur. J. Pharmacol.* 1989;159(1):83-88.
- Fernandez de Molina A, Hunsperger RW. Central representation of affective reaction in forebrain and brainstem: electrical

- stimulation of amygdala, stria terminales and adjacent structures. *J. Physiol.* 1959;145:251-265.
- Fernandez de Molina A, Hunsperger RW. Organization of the subcortical system governing defense and flight reaction in the cat. *J. Physiol.* 1962;160:200-213.
- File SE, Andrews N, Hogg S. New developments in animal tests of anxiety. In: Westenberg HGM, Den Boer JA, Murphy DL, editors. *Advances in the Neurobiology of Anxiety Disorders*. Chichester, UK, Wiley. 1996;p.61-79.
- File SE, Zangrossi H Jr. "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze or the development of a phobic state? *Psychopharmacol.* 1993;110(1-2):240-4.
- File SE. Behavioral detection of anxiolytic action. In: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*, Wiley, Manchester, 1992.p. 25-44.
- File, SE, Gonzalez, LE, Gallant, R. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia. *Neuropsychopharmacol.* 1998;19:397-405.
- Flood JF, Morley JE, Lanthorn TH. Effect on memory processing by D-cycloserine, an agonist of the NMDA/glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 221(2-3):249-254.
- Fyer A. Current approaches to etiology and pathophysiology of specific phobia. *Biol. Psychiatry* 1998;44:1295-1304.
- Goodchild AK, Dampney RAL, Bandler R. A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *J. Neurosci. Meth.* 1982;6:351-363.
- Gorman JM, Kent JM, Sullivan GM, Coplan JD. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *Am. J. Psychiatry* 2000;157(4):493-505.
- Graeff FG, Carobrez AP, Silveira MCL. Excitatory amino acids and the brain aversive system. In: Cavalheiro EA, Lehmann J, Turski L, editors. *Neurology and neurobiology*, vol. 46. *Frontiers in excitatory amino acids research*. New York: Liss, 1988. p.325-332.
- Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav. Brain Res.* 1993;58(1-2):123-131.
- Graeff FG. Brain defense systems in anxiety. In: *Handbook of anxiety*. Amsterdam: Elsevier, 1990.p.307-354.
- Graeff FG. Minor tranquilizers and brain defense systems. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1981;14:239-265.
- Graeff FG. Neurotransmitters in the dorsal periaqueductal gray and animal model of panic anxiety. In: Briley M, File SE, editors. *New concepts in anxiety*. London: Macmillan, 1991. p 288-312.

- Graeff FG. Role of 5HT in defense behavior and anxiety. *Rev. Neurosci.* 1993;4:181-211.
- Gray JA, McNaughton N. The neurophychology of anxiety. Second edition. New York: Oxford University Press, 2000.
- Gray JA. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septohippocampal system. Oxford: Oxford University Press, 1982.
- Griebel G. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol. Ther.* 1995;65(3):319-95.
- Guimaraes FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 1991;103(1):91-94.
- Hamilton BL. Citoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1973;149:1-28.
- Handley SL, McBlane JW. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 1993;29:129-138.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1984;327:1-5.
- Hilton SM. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J. Exp. Biol.* 1982;100:159-174.
- Hirai H, Kirsch J, Laube B, Betz H, Kuhse J. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93(12):6031-6036.
- Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors, *Ann. Rev. Neurosci.* 1994;17:31-108.
- Holmes A, Rodgers RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998;60(2):473-88.
- Holstege G. Descending pathways from the periaqueductal gray and adjacent areas. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, 1991.p.239-265.
- Hunsperger RW. Affektraktionen auf elektrishe reizung im hirnstamm der katze. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 1956;14:70-92.
- Jansen ASP, Farkas E, Mac Sams J, Loewy AD. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. *Brain res.* 1998;784:329-336.

- Jenck F, Moreau JL, Martin JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res.* 1995;57:181-191.
- Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987;325:529-531.
- Kalynchuk LE, Pinel JPJ, Treit D, Kippin TE. Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats. *Biol. Psych.* 1997;41:438-451.
- Kehne JH, McCloskey TC, Baron BM, Chi EM, Harrison BL, Whitten JP, Palfreyman MG. NMDA receptor complex antagonists have potential anxiolytic effects as measured with separation-induced ultrasonic vocalizations. *Eur. J. Pharmacol.* 1991;193:283-292.
- Kemp JA, Leeson PD. The glycine site of the NMDA receptor - five years on. *Trends of Pharmacol. Sci.* 1993;14:20-25.
- Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988;241(4867):835-837.
- Krieger JE, Graeff FG. Defensive behavior and hypertension induced by glutamate in the midbrain central gray of the rat. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1985;18:61-67.
- Krieger MS, Conrad LCA, Pfaff DW. An autoradiographic study of the efferent projections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 1979;183:785-816.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 1997;18(3):493-503.
- Lee C, Rodgers RJ. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology* 1990;102(4):507-513.
- Leeson PD, Iversen LL. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potencial. *J. Med. Chem.* 1994;37:4053-4067.
- Leeson PD. Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: *Drug Design for Neuroscience*. New York: Raven Press, 1993.p.339-381.
- Lester RA, Tong G, Jahr CE. Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 1993;13(3):1088-1096.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180-185.
- Lonstein JS, Stern JM. Somatosensory contributions to c-fos activation within the caudal periaqueductal gray of lactating rats:

- effects of perioral, rooting, and suckling stimuli from pups. *Horm. Behav.* 1997;32(3):155-166.
- Lovick TA; Key BJ. Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal grey matter of the rat. *Exp. Brain Res.* 1996; 108(3):382-388.
- Maes M, Debacker G, Suy E and Minner B. Increased plasma serine concentrations in depression. *Neuropsychobiology* 1995;31:10-15.
- Malpeli JG, Schiller PH. A method of reversible inactivation of small regions of brain tissue. *J. Neurosci. Meth.* 1979; 1:143-151.
- Malpeli JG. Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J. Neurosci. Meth.* 1999;86:119-128.
- Mantyh_a PW. Forebrain projections to the periaqueductal gray in the monkey, with observation in the cat and rat. *J. Comp. Neur.* 1982;206:146-158.
- Mantyh_b PW. The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat, and monkey: a Nissl, Weil, and Golgi analysis. *J. Comp. Neur.* 1982;204:349-363.
- Marek P, Beneliyahu S, Gold M and Liebeskind JC. Excitatory amino acid antagonist (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res.* 1991;547:77-81.
- Matheus MG, Nogueira RL, Carobrez AP, Graeff FG, Guimaraes FS. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology* 1994;113(3-4):565-569.
- McCulloch J. Excitatory amino acid antagonists and their potential for the treatment of ischaemic brain damage in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1992;34:106-114.
- McDougall A, Dampney R, Bandler R. Cardiovascular components of the defence reaction evoked by excitation of neuronal cell bodies in the midbrain periaqueductal grey of the cat. *Neurosci. Lett.* 1985;60(1):69-75.
- McGeer, P.L. and McGeer, E.G. Amino acid neurotransmitters. In: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, Molinoff P, editors. *Basic Neurochemistry*. 4th ed. New York: Raven Press., 1989.p.311-332.
- Meldrum B. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. *Clin. Sci.* 1985;68:113-122.
- Meller ST, Dennis BJ. Afferent projections to the periaqueductal gray in the rabbit. *Neuroscience* 1986;9(3):927-964.
- Meller ST, Dennis BJ. Quantitative Nissl study of the neuronal types, and recognition of cytoarchitectural subdivisions, within the rabbit periaqueductal gray. *J. Comp. Neurol.* 1990;302(1):87-99.

- Menard J, Treit D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999;23(4):591-613.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989;29: 365-402.
- Monahan JB, Handelsmann GE, Hood WF, Cordi AA. D-cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989;34(3):649-653.
- Montgomery KC. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Neurol.* 1955;48:254-260.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12(3):529-540.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg P. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992;256(5060):1217-1221.
- Morgan CA, Grillon C, Southwick SM, Davis M, Charney DS. Fear-potentiated startle in post traumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 1995;38:378-385.
- Morris RGM. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* 1989;9:3040-3057.
- Mos J, Kruk MR, Van Der Poel AM, Meelis W. Aggressive behavior induced by electrical stimulation in the midbrain central gray of male rats. *Agres. Behav.* 1982;8:261-284.
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;25;97(9):4926-4931.
- Murphy AZ, Shupnik MA, Hoffman GE. Androgen and estrogen (alpha) receptor distribution in the periaqueductal gray of the male Rat. *Horm Behav* 1999;36(2):98-108.
- Nahum-Levy, R., Lipinski, D., Shavit, S. and Benveniste, M. Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. *Biophys. J.* 2001;80:2152-2166.
- Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG. Sensation evoked by stimulation in the midbrain of man. *J. Neurosurg.* 1969;30:14-24.

- Nauta WJH. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat brain. *Brain* 1958;81:319-340.
- Olney JW. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J. Neural Transm. Suppl.* 1994;43:47-51.
- Omori N , Ishimoto T, Mutoh F, Chiba S. Kindling of the midbrain periaqueductal gray in rats. *Brain Res.* 2001; 903:162-167.
- Onstott D; Mayer B; Beitz AJ. Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of rat: analysis using laser confocal microscopy. *Brain Res.* 1993;610:317-324.
- Paakkari I; Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. *Annals of medicine* 1995; 27:369-377.
- Paquet M, Smith Y. Presynaptic NMDA receptor subunit immunoreactivity in GABAergic terminals in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 2000;423(2):330-347.
- Paxinos G; Carrive P; Wang H; Wang PY. Chemoarchitectonic atlas of the rat brainstem. San Diego: Academic Press, 1999.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, fourth edition. San Diego: Academic Press, 1998.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.* 1985;14:149-167.
- Pfaff DW, Lewis C, Diakow C, Keiner M. Neurophysiological analysis of mating behavior responses as hormone sensitive reflexes. In: *Progress in Physiological Psychology*, vol. 5, Academic Press, New York, 1973.
- Pin JP, Duvoisin R. Review: neurotransmitter receptor I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.* 1995;34:1-26.
- Porter JH, Wiley JL, Balster RL. Effects of phencyclidine-like drugs on punished behavior in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989;248:997-1002.
- Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ. Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol.* 1995;48(5):841-848.
- Ranck JB Jr. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res.* 1975;98(3):417-40.
- Redgrave P, Dean P. Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press, 1991.p.199-209.

- Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. *Science* 1969;161:444-445.
- Richards DA; Lemos T; Whitton, PS; Bowery NG. Extracellular GABA in the ventrolateral thalamus of rats exhibiting spontaneous absence epilepsy: a microdialysis study. *J Neurochem*. 1995;65(4):1674-80.
- Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J. Comp. Neurol*. 1991;303(1):121-131.
- Rizvi TA, Ennis M, Shipley MT. Reciprocal connections between the medial preoptic area and the midbrain periaqueductal gray in rat: a WGA-HRP and PHA-L study. *J. Comp. Neurol*. 1992;315(1):1-15.
- Rodgers RJ, Cole JC. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper SJ, Hendrie CA, editors. *Ethology and Psychopharmacology*. New York: Wiley, 1994. p.9-44.
- Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol. Behav*. 1999;68(1-2):47-53.
- Rodgers, RJ, Johnson, NJT, Carr, J, Hodgson, TP. Resistance of experientially induced changes in murine plus-maze behavior to altered retest conditions. *Behav. Brain Res*. 1997;6:71-77.
- Rodgers, RJ, Johnson, NJT, Cole, JC, Dewar, CV, Kidd, GR, Kimpson, PH. Plus-maze retest profile: importance of initial stages of trial 1 and response to post-trial cholinergic receptor blockade in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1996;54:41-50.
- Rossetti ZL, Carboni S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol*. 1995;283:177-183.
- Russo AS, Guimarães FS, De-Aguiar JC, Graeff FG. Role of benzodiazepine receptors located in the dorsal periaqueductal gray in anxiety. *Psychopharmacology* 1992;110:198-202.
- Salt TE. Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and d-serine in the rat thalamus in vivo. *Brain Res*. 1989;481:403-406.
- Sandkuhler J, Herdegen T. Distinct patterns of activated neurons throughout the rat midbrain periaqueductal gray induced by chemical stimulation within its subdivisions. *J. Comp. Neurol*. 1995;357(4):546-553.
- Saper CB. Central Autonomic System. In: Paxinos G. *The rat nervous system*. 2nd edition. Academic Press, San Diego, 1995.
- Schell MJ, Brady RO Jr, Molliver ME, Snyder SH. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat

- brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci.* 1997;17(5):1604-1615.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudre EC, Vargas LC. Modeling panic attacks. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2001;25(7-8):647-659.
- Schenberg LC, De-Aguiar JC, Salgado HC, Graeff FG. Depressant action of chlordiazepoxide on cardiovascular and respiratory changes induced by aversive electrical stimulation of the brain. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1981;14:69-72.
- Schenberg LC, Graeff FG. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1978;9:287-295.
- Schmitt ML, Coelho W, Lopes-de-Souza AS, Guimarães FS, Carobrez AP. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci. Lett.* 1995;189:93-96.
- Schmitt ML, Graeff FG, Carobrez AP. Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1990;23(8):677-679.
- Shipley MT, Ennis MT, Rizvi TA, Behbehani MM. Topographical specificity of forebrain inputs to the midbrain periaqueductal gray: evidence for discrete longitudinally organized input columns. In: Depaulis A, Bandler R. (eds), *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*, Plenum Press, New York, 1991.p. 417-448.
- Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 1993;56(1):115-118.
- Singewald N, Sharp T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience* 2000;98(4):759-770.
- Skultety FM. Stimulation of periaqueductal gray and hypothalamus. *Arch. Neurol. Psychiat.* 1963;8:608-620.
- Stephens DN, Meldrum BS, Weidmann R, Schneider C, Grutzner M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacology* 1986;90(2):166-169.
- Supplisson S, Bergman C. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci.* 1997;17(12):4580-4590.
- Teixeira KV, Carobrez AP. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats' performance in the elevated plus-maze task. *Behav. Neurosci.* 1999;113(1):196-203.
- Teixeira KV. Efeitos comportamentais produzidos pela microinjeção de compostos glicinérgicos ao longo do eixo rostrocaudal da Substância

- Cinzenta Periaquedutal Dorsal de ratos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 1997.
- Thiels E, Weisz DJ, Berger TW. In vivo modulation of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long term potentiation by the glycine modulatory site. *Neuroscience* 1992;46:501-509.
- Thomson AM. Glycine is a coagonist at the NMDA receptor/channel complex. *Progress in Neurobiology* 1990;35:53-74.
- Tolle TR, Berthele A, Zieglgansberger W, Seeburg PH, Wisden W. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J. Neurosci.* 1993;13(12):5009-5028.
- Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1993;44(2):463-469.
- Trullas R, Jackson B, Skolnick P. Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropylcarboxylic acid, a ligand at strychnine insensitive glycine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1989;34:313-316.
- Tsien, JZ. Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Current Opinion in Neurobiology* 2000;10:266-273.
- Valverde-Navarro AA, Olucha FE, Garcia-Verdugo JM, Hernandez-Gil T, Ruiz-Torner A, Martinez-Soriano F. Distribution of basal-expressed c-fos-like immunoreactive cells of the periaqueductal grey matter of the rat. *Neuroreport* 1996;7(15-17):2749-2752.
- Vander-Horst VG, Schasfoort FC, Meijer E, van Leeuwen FW, Holstege G. Estrogen receptor-alpha-immunoreactive neurons in the periaqueductal gray of the adult ovariectomized female cat. *Neurosci. Lett.* 1998;240(1):13-16.
- Walker DL, Cassella JV, Lee Y, De Lima TC, Davis M. Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997;21(6):743-753.
- Walker DL, Davis M. Involvement of the dorsal periaqueductal gray in the loss of fear-potentiated startle accompanying high footshock training. *Behav. Neurosci.* 1997;111:692-702.
- Walker DL, Ressler KJ, Lu K, Davis M. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of d-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *J. Neurosci.* 2002;22(6):2343-2351.
- Wang YT, Salter MW. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* 1994;369:233-235.
- Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1981;21:165-204.
- Wilcox KS, Fitzsimonds RM, Johnson B, Dichter MA. Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 1996;76(5):3415-3424.

- Wisden W, Seeburg PH, Monyer H. AMPA, kainate and NMDA ionotropic glutamate receptor expression - an in situ hybridization atlas. In: Ottersen OP, Storm-Mathisen J, editors. Handbook of chemical neuroanatomy, vol 18: Glutamate. Amsterdam: Elsevier Science, 2000. p.99-143.
- Wood PL, Emmett MR, Rao TS, Mick S, Cler J, Iyengar S. In vivo modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine: potentiation of ongoing neuronal activity as evidenced by increased cerebellar cyclic GMP. J. Neurochem. 1989;53:979-981.
- Wood PL. The co-agonist concept: is the NMDA-associated glycine receptor saturated in vivo? Life Sci. 1995;57:301-310.
- Zafra F, Gomeza J, Olivares L, Aragon C, Gimenez C. Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. Eur. J. Neurosci. 1995;7(6):1342-1352.